

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SALOÊ BISPO POUBEL

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Leishmania infantum x *L. chagasi* PROCEDENTES DE
VÁRIAS REGIÕES DO BRASIL

CURITIBA

2010

SALOÊ BISPO POUBEL

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Leishmania infantum x *L. chagasi* PROCEDENTES DE
VÁRIAS REGIÕES DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-Orientador Prfa. Dra. Edilene A. Castro

CURITIBA

2010

Dedico este Trabalho

... Ao meu marido querido, Jackson, a quem me tanto
me ajudou para a realização desse trabalho;

...Aos meus amados filhos Luiz Alonso e Guilherme.

Agradecimentos Especiais

... Aos meus pais, Itaiá e Lúcia pelo carinho e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, a quem exprimo a minha gratidão, meu muito obrigada pela paciência, pela orientação e preocupação constante, obrigada por me fazer crescer não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Dedicção, ética e competência fazem de você uma pessoa única e especial.

A coordenadora do curso de Pós-Graduação, Professor Dr. Edilene A. Castro pela dedicação e empenho dispensados ao curso de Pós Graduação que muito colaborou com este trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

Ao Corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento.

A Doutora Magda Ribeiro pela imprescindível ajuda.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Aos amigos do mestrado que foram muito especiais nesta fase da minha vida.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se
e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda
que em vão, que sentar-se fazendo nada até o
final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias
tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade viver...”*

Martin Luther King

RESUMO

O objetivo central deste trabalho foi estudar a variabilidade genética inter e intra-específica de *L. chagasi*/*L. infantum* de amostras de cães e humanos por meio de técnicas moleculares. Foram analisados 27 cães e 11 proprietários provenientes de sete Estados do Brasil, tendo sido obtidos 20 isolados do parasito em cães e uma em humano. Os isolados foram submetidos à identificação por PCR com o iniciador RV1/RV2 que permitiu amplificar fragmento gênico idêntico à cepa referência de *L. infantum*. Através da técnica de RAPD foi observada variabilidade genética intra-específica das amostras provenientes do Brasil e do Velho Mundo. Quando submetidos à endonuclease de restrição RsaI, os isolados mostraram-se monomórficos e similares a cepa referência do Velho Mundo. O sequenciamento da região K26 apresentou variabilidade genética entre as amostras. Na análise filogenética, alguns isolados se agruparam com cepas de *L. infantum* do Velho Mundo, enquanto outros se agruparam em clados independentes. O que corrobora a hipótese que *L. infantum* e *L. chagasi* poderiam ser simpátricas nas Américas. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral, fenéticos e filogenéticos sobre *L. infantum*/*L. chagasi* são discutidos no presente trabalho.

Palavras-chave: RAPD, RFLP, sequenciamento, PCR-K26.

ABSTRACT

The main objective was to study the genetic variability within and between specific *L. chagasi* / *L. infantum* samples of dogs and humans using molecular techniques. We analyzed 27 dogs and 11 owners from seven states in Brazil, having been obtained 20 isolates of the parasite in dogs and in humans. The isolates were submitted to identification by PCR with the primer that allowed RV1/RV2 amplify gene fragment identical to the reference strain of *L. infantum*. By RAPD was observed intra-specific genetic variability of samples from Brazil and the Old World. When subjected to restriction endonuclease RsaI, the isolates were monomorphic and similar to reference strain of the Old World. The sequencing of the K26 region showed genetic variability between samples. Phylogenetic analysis, some isolates clustered with strains of *L. infantum* in the Old World, while others were grouped into clades independent. What supports the hypothesis that *L. infantum* *L. chagasi* and could be sympatric in the Americas. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis, Phenetic and phylogenetic studies on *L. infantum* / *L. chagasi* are discussed in this work.

Keywords: RAPD, RFLP, sequencing, PCR-K26.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cladograma mostrando relação filogenética.....	20
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania chagasi</i>	22
Figura 3. Fêmea hematófaga do <i>Lutzomyia longipalpis</i> após repasto sanguíneo.....	22
Figura 4a. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral.....	24
Figura 4b. Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral no Brasil.....	25
Figura 5. Sequência do gene K26 de <i>L.infantum</i> MON-1.....	29
Figura 6. Eletroforese mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR dos de <i>Leishmania</i> usando os iniciadores RV1 e RV2.....	44
Figura 7a RAPD dos isolados com o iniciador A3 dos isolados de LV de cães e humano. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	46
Figura 7b. RAPD dos isolados com o iniciador A3.Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	46
Figura 8a. RAPD dos isolados com o iniciador A9. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	47
Figura 8b. RAPD dos isolados com o iniciador A9. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	47
Figura 9a. RAPD dos isolados com o iniciador A10. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	48
Figura 9b. RAPD dos isolados com o iniciador A10. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.....	48
Figura 10. Fenograma dos isolados e cepas referência de <i>Leishmania</i> gerado pelo programa UPGMA com agrupamento pelo coeficiente de Jaccard.....	50
Figura 11. Árvore não enraizada, a partir de eletroforese de RAPD realizadas com três iniciadores (A3, A9, A10).....	51
Figura 12. Filograma de Nei-li's dos isolados e cepas referência de <i>Leishmania</i> , a partir de eletroforeses de RAPD realizadas com três iniciadores (A3, A9, A10).....	52

Figura 13. PCR dos isolados com iniciadores K26.....	53
Figura 14. Amplificação de fragmento gênico K26 por PCR dos isolados.....	54
Figura 15. Perfil das bandas obtidas após a digestão com a endonuclease Rsa1 do produto de PCR do gene K26.....	55
Figura 16. Neighbor joining do gene K26 de cepas da Europa.....	56
Figura 17a. Traçado da construção do gasoduto Bolívia Brasil.....	60
Figura17b. Modificações ambientais observadas durante a construção do gasoduto.....	60

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Patologia e distribuição geográfica das leishmanioses que acomete o homem.....	23
Quadro 2. Endonuclease de restrição utilizada na PCR-RFLP.....	40
Quadro 3. Dados dos isolados com suas procedências e resultados dos exames sorológicos e PCR para diagnóstico da leishmaniose visceral.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm:	Micrometro
µg:	Micrograma
A:	Adenina
C:	Citosina
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP:	Deoxinucleotídeos Trifosfato
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme</i> -Linked ImmunoSorbent Assay- <i>ELISA</i>)
ETOH:	Etanol
F:	Forward
g:	Grama
G:	Guanina
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄ :	Ácido Sulfúrico
IgG:	Imunoglobulinas G
IgM:	Imunoglobulinas M
K26:	Proteína hidrofílica de superfície de <i>Leishmania major</i>
L:	Litro
LV:	Leishmaniose visceral
M:	Molar
mg/L:	Miligramas por Litro
MgCl ₂ :	Cloreto de Magnésio
Min:	Minutos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
NNN:	Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
OMS:	Organização Mundial da Saúde
°C:	Graus Celsius
PB:	Pares de Base
PBS:	Solução Salina Tamponada (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR:	Reação em Cadeia pela Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
pH:	Potencial de Hidrogênio
PM:	Peso Molecular
<i>Primer</i> :	Oligonucleotídeos iniciadores
R:	Reverse
RAPD:	Amplificação Randômica do DNA Polimórfico
RIFI:	Imunofluorescência Indireta
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNase:	Ribonuclease
Rpm:	Rotações por minuto
RPMI	Meio de Cultura
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio
SFS:	Soro Fetal Bovino

T:	Timina
TE:	Tris-EDTA
TBE:	Tris borato EDTA
UFPR:	Universidade Federal do Paraná
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
1.2 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO – RAPD	18
1.3 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO – RFLP.....	19
1.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.....	20
1.5 GENOMA E SEQUENCIAMENTO.....	21
2.GENERALIDADES.....	23
2.1 SISTEMÁTICA.....	24
2.2 CICLO DE VIDA DO PARASITA.....	25
2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNDO, NAS AMÉRICAS E NO BRASIL.....	28
2.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>Leishmania</i>	30
2.5 ISOENZIMAS.....	30
3.OBJETIVO GERAL	32
3.1OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	32
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	34
4.1 EXAMES COMPLEMENTARES DOS CÃES.....	34
4.2 SOROLOGIA.....	34
4.3 ISOLADOS.....	35
4.4 CEPAS REFERÊNCIAS DE <i>Leishmania</i>	36
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	36
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	37
4.7 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMORFICO RAPD	38
4.8 ANÁLISE FENÉTICA.....	39
4.9 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DERESTRIÇÃO RFLP-PCR.....	39
4.10 SEQUENCIAMENTO.....	40
4.11 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS.....	41
5.RESULTADOS.....	42
5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Leishmania</i>	43
5.1 AMPLIFICAÇÃO ALEATORIA DE DNA POLIMÓRFICO(RAPD).....	45
5.2 PCR COM INICIADORES K26.....	53
5.3 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO(RFLP).....	54
5.4 SEQUENCIAMENTO.....	55
6.DISSCUSSÃO.....	57
7.CONCLUSÃO.....	64
8.REFERÊNCIAS.....	66

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do complexo *L. donovani* e *L. infantum*. No ciclo evolutivo, o parasito é digênico tendo como hospedeiros vertebrados cães e o homem e, como hospedeiro invertebrado insetos pertencente ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Nos hospedeiros vertebrados parasitam as células do sistema fagocitário mononuclear de órgãos profundos e nos insetos vetores localizam-se no intestino (COURA, 2005).

A doença tem distribuição geográfica Mundial e está presente em 47 países com uma incidência anual estimada em 500.000 casos. Noventa por cento deles ocorrem na Índia, Brasil e Sudão (DESJEUX, 1996). No sudoeste da Europa, no norte e leste da África, a leishmaniose visceral é causada por *L. infantum*. Na Etiópia, Sudão e Índia é causada principalmente pela *L. donovani*, sendo que no Sudão alguns casos também são causados por *L. infantum* (HARALAMBOUS et al., 2008).

Nas Américas há registro da doença e do parasito tanto na América do Sul como na América central (LAINSON e SHAW, 1987, DEDET, 2009).

No Brasil a LV está presente em quase todas as regiões indo do norte e nordeste até as regiões centro-oeste e sudeste. As alterações climáticas, a migração humana e as alterações ambientais fizeram grandes mudanças no perfil de distribuição, com adaptações a áreas peri urbanas e urbanas (BRASIL, 2006). Atualmente, a LV é considerada endêmica em 21 estados do país com notificações de 3.187 casos por ano nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país (Dantas Torres et al., 2006; MADEIRA, 2009).

Na América do Sul a etiologia da doença é atribuída a *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937). Segundo Lainson e Shaw (1979) existem várias hipóteses relacionadas com a origem de *L. chagasi*, e, propõem que a LV na América pudesse ser causada por ambos parasitas *L. chagasi* e *L. infantum*. Devido a grande semelhança observada entre os agentes causadores de LV no Velho e Novo Mundo, Killick-Kendrick et al. (1980) propõem a hipótese que *L. chagasi* teria uma origem afro-europeana recente e que o parasita poderia ter sido trazido por cães infectados que acompanhavam os conquistadores portugueses e espanhóis. Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo Moreno et al. (1986), demonstram que o parasito é semelhante à *L. infantum*.

LAINSON et al., 1987; LAINSON, 1989 contestam e argumentam que *L. chagasi* já existiria muito antes da colonização, uma vez que canídeos silvestres foram

encontrados infectados e foram observadas diferenças nos perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de suas promastigotas.

Em sua proposta de uma nova classificação para o gênero *Leishmania* Rioux et al. (1990) sugerem que *L.chagasi* passe a ser sinônima de *L.infantum* por respeito às regras de nomenclatura. Thomaz-Soccol et al. (1993) em sua classificação geral para *Leishmania* do Novo Mundo propuseram a manutenção de sinônimia.

Estudos mais recentes recomendam a revisão da taxonomia de *L.chagasi*. Vários autores propõem que *L.chagasi* seja vista como sinônimo de *L.infantum* (MAURICIO et al., 2000; DANTAS-TORRES, 2006), ou que *L.chagasi* seja considerada como subespécie de *L.infantum* (SHAW, 2006). Atualmente métodos moleculares, tais como RAPD, PCR, RFLP e sequenciamento, têm demonstrado distinção genética entre as espécies de *L.infantum* e *L.chagasi* (SHAW, 2006; DANTAS-TORRES, 2006; SCHALLING e OSKAM, 2002).

Estudos sobre o polimorfismo genético conduz para uma melhor compreensão da estrutura populacional do parasita (GUPTA e ANDERSON, 1999).

A técnica de RAPD é uma técnica que utiliza sequência arbitrária com um único iniciador, para amplificar fragmentos de DNA (WILLIAMS et al., 1990). As informações fornecidas pelos padrões de bandas geradas pela técnica são de grande utilidade em mapeamento genético (LIMA et al., 1998), podendo ser útil para estudos de população de uma determinada espécie de parasito em diferentes localidades e estudos epidemiológicos (GOMES et al., 1995).

A PCR revolucionou o mundo científico com suas inúmeras aplicações, indo do diagnóstico médico ao mapeamento genético e muito utilizado para estudo de genética de populações (ANTHONY et al., 1999). Com relação aos estudos de leishmaniose a maior parte destes ensaios tem como alvo o DNA do cinetoplasto ou região não codificadoras, tais como, regiões intergênicas, sequência de genes repetidas e sequências de microssatélites.

A tipagem molecular do gene K26 que codifica uma sequência alvo K26, região altamente específica para *L.infantum* (BHATIA et al., 1999) foi escolhida pelo seu poder discriminatório para *Leishmania* do complexo donovani (HARALAMBOUS et al., 2008).

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na amplificação pela PCR de uma região de escolha do genoma e a subsequente digestão desse fragmento com enzimas de restrição, que são capazes de reconhecer e clivar a fita dupla da molécula de DNA em sítios

específicos. Haralambous et al. (2008) relacionaram o polimorfismo genético com origem geográfica de isolados provenientes de pacientes com LV provenientes da Índia, Ásia, África e Europa

A técnica de sequenciamento tem sido amplamente explorada em busca de maiores informações sobre a sequência de DNA de *Leishmania* a fim de aperfeiçoar o diagnóstico e a identificação das espécies (SCHALLING e OSKAM, 2002). Em 2005, o genoma da *Leishmania major* foi completamente sequenciado e toda sequência, assim como as proteínas preditas estão disponíveis ao acesso público (IVENS et al., 2005). O projeto genoma de *Leishmania* veio acumulando informações acerca da estrutura e organização genômica deste parasito, agora *L.infantum* e *L.braziliensis* (PEACOCK et al., 2007) já possuem seu genoma armazenados em bancos *on-line*.

Apesar do Estado do Paraná não ser área endêmica para LV o encontro de animais e humanos infectados, o isolamento de cepas do parasito provenientes de diferentes áreas endêmicas do Brasil conduz para o conhecimento sobre a variabilidade intra-específica do parasito e auxiliar no esclarecimento sobre a posição taxonômica de *L.chagasi* e *L.infantum*. Para tanto, foi utilizado ferramentas moleculares (RAPD, PCR, RFLP e sequenciamento) na pesquisa de polimorfismo genético inter e intraespecífico de isolados do parasito.

1.2. AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO – RAPD

Trabalhos têm mostrado que a técnica de RAPD é uma importante ferramenta para estudos filogenético e taxonômicos para *Leishmania*, detectando polimorfismos genéticos intra-específicos (PEREIRA et al., 2008; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

O RAPD amplificação aleatória do DNA utiliza oligonucleotídeos aleatórios para reconhecer sítios específicos, porém desconhecidos do genoma, que na maioria são polimórficos. A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de iniciadores utilizados, um perfil de bandas será formado pelo conjunto de produtos de amplificação (WILLIAMS et al., 1990).

O RAPD é uma ferramenta que pode ser utilizada para estudar qualquer organismo permitindo fazer comparações diretas sobre a diversidade genética e

estrutura de populações. Por utilizar iniciadores de sequência arbitrária, a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada. Técnicas de análise de DNA que demandam o uso de iniciadores específicos para a amplificação de determinadas sequências dificilmente poderiam ser usadas para o estudo de um grande número de espécies sobre as quais praticamente não há nenhum tipo de informação sobre características genéticas, demográficas ou ecológicas (NASON et al., 1997).

A técnica de RAPD também tem sido usada para o estabelecimento de relações filogenéticas e diferenciação de espécies próximas, bem como para a detecção de híbridos. Por produzir um grande número de marcadores, a técnica de RAPD permite encontrar alguns gêneros, espécies, subespécies ou raças, tornando a técnica interessante para o estabelecimento de relações taxonômicas (LACERDA et al., 2002).

Segundo Noyes et al. (1996) a técnica de RAPD é utilizada para identificação de polimorfismo genético inter e intra-específico em parasitos do gênero *Leishmania* com ótimos resultados. Motazedian et al. (1996) conseguiram distinguir as principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (*L.tropica*, *L.major* e *L.infantum*) utilizando a técnica de RAPD.

1.3. POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO – RFLP

Há 25 anos os marcadores de Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) foram estudados pela primeira vez em um experimento destinado à detecção de mutações em DNA de vírus (GRODZICKER et al., 1974). Em pouco tempo este marcador tornou-se uma ferramenta importante em várias áreas de biologia e tem sido utilizado para aprofundar o conhecimento de diferentes temas biológicos (BOTSTEIN et al., 1980).

A técnica de PCR-RFLP é baseada na amplificação pela PCR de um sítio específico do DNA e a subsequente digestão desse fragmento com diversas enzimas de restrição. Chicharro et al. (2002) utilizaram esta técnica para estudos de variabilidade em *Leishmania*. Haralambous et al. (2008) conseguiram relacionar polimorfismo genético em relação à origem geográfica de isolados provenientes de pacientes com LV

da Índia, Ásia, África e Europa. Em estudos de epidemiologia molecular de *L.infantum* utilizando a técnica de PCR-RFLP, Morales et al. (2001, 2002) distinguiram cepas procedentes do ciclo artificialmente antroponótico, no qual a inoculação do parasito é mecânica por meio de seringas entre os usuários de drogas e o ciclo zoonótico em que cão e homem estão envolvidos. Mauricio et al. (2001) quando compararam *L.infantum* e *L.chagasi* utilizando a região ITS26 com a técnica de PCR-RFLP e RAPD, com cepa MHOM/PA/78/WR 285 proveniente do Panamá, MCAN/BR/89/DOG 124 de cão e a MHOM/BR/74/PP 75 de humano, não detectaram diferenças entre as espécies .

1.4. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Em 1983, uma nova técnica foi desenvolvida por Kary Mulli, da Cetus Corporation, que se tornou amplamente utilizada para amplificar fragmentos específicos de DNA sem a necessidade de células bacterianas. Esta técnica ficou conhecida como reação em cadeia da polimerase PCR.

Com a possibilidade de realizar as reações automaticamente, diversas técnicas baseadas na PCR foram descritas por vários autores, essas técnicas tem possibilitado o estudo da diversidade genética dentro de populações e o melhor entendimento das relações filogenéticas das espécies (SAIKI et al., 1985; GOMES et al., 1995; TOLEDO et al., 2002).

Em estudo de sensibilidade dos diferentes métodos de PCR para o diagnóstico da LV, Lachaud e colaboradores (2002) testaram a eficiência do iniciador Rv1 e Rv2 provenientes do minicírculo do kDNA, este apresentou uma eficácia de 100% na detecção de *Leishmania donovani* sensu lato, para cães sintomáticos e assintomáticos soro positivo, sendo excelente para diagnóstico de LV.

O antígeno K26 de *L.infantum* é homólogo a proteína hidrofílica de superfície de *L. major*, com uma região altamente variada de 14-aminoácidos. Análises mostraram que o gene K26 é conservado e específico do complexo *L.donovani* sendo muito usado como marcador de diagnóstico para leishmaniose visceral (BHATIA et al., 1999).

A região K26 de *L.infantum* (Fig. 5) é 64% idêntica a da *L.major*, na qual apresenta um grande polimorfismo. A partir desses conhecimentos é que Haralambus et al. (2008) desenvolveram um método de tipagem molecular, com grande poder discriminatório entre *Leishmania* e excelente para estudos de diversidade genética de *L.donovani* e *L.infantum*.

```

1      11      21      31      41      51      60
|      |      |      |      |      |      |
ATGGGAGCCT ACTGCACGAA GGACTCCGCA AAGGAGCCCC AGAAGCGTGC TGATAACATC 60
CATAAAACCA CTGAGGCCAA TCACAGAGGC GCCGCCGGTG TGCCCCCGAA GCACGCCGGC 120
GGTGCATGA ACGACTCTGC CCCGAAGGAG GATGGCCATA CACAGAAAAA TGACGGCGAT 180
GGCCCTAAGG AGGACGGCCA TACACAGAAA AACGACGACG GTGGCCCTAA GGAGGACGGC 240
CATACACAGA AAAATGACGG CGATGGCCCT AAGGAGGACG GCCGTACACA GAAAAATAAC 300
GGCGATGGCC CTAAGGAGGA CGGCCATACA CAGAAAAATG ACGGCGATGC CCCTAAGGAG 360
GACGGCCGTA CACAGAAAAA TGACGGCGAT GGCCCTAAGG AGGACGGCCG TACACAGAAA 420
D G R T Q K N D G D G
AATGACGGCG ATGGCCCTAA GGAGGACGGC CGTACACAGA AAAATGACGG CGATGGCCCT 480
AAGGAGGACG GCCGTACACA GAAAAATGAC GGCGATGGCC CTAAGGAGGA CGGCCATACA 540
CAGAAAAATG ACGGCGATGG CCCTAAGGAG GACGGCCGTA CACAGAAAAA TGACGGCGGT 600
GGCCCTAAGG AGGATGAGAA TCTGCAGCAA AACGATGGGA ATGCGCAGGA GAAGAACGAA 660
GATGGACACA ACGTGGGGGA TGGAGCTAAC GGCAATGAGG ATG GTAACGA TGATCAGCCG 720
AAGGAGCAGG TTGCCGGCAA CTAG 744

```

Figura 5 - Sequência do gene K26 de *L. infantum* MON-1 MCAN/ES/98/LLM-877. As setas indicam a posição Forward e Reverse utilizadas para produção dos primer, a região mostrada dentro de caixas é o sitio de restrição da enzima Rsa1 – Fonte: Haralambous et al. (2008).

1.5. GENOMA E SEQUENCIAMENTO

Leishmania possui dois genomas, representado pelo DNA nuclear e pelo kDNA, este conhecido como cinetoplasto, sendo incomum porque possui uma rede compacta de maxicírculos e milhares de minicírculos que juntos formam uma rede compacta de DNA, que corresponde entre 15% e 35% do DNA total da célula (BARKER, 1981; SIMPSON 1987).

Leishmania major foi a primeira espécie escolhida para sequenciamento do genoma e está sendo sequenciado pelo Sanger Center, Cambridge (www.sanger.ac.uk/projects/L.maj)

Juntos com estas sequências encontram-se também a sequência de outras espécies de *Leishmania* que vem sendo depositadas em bancos de dados como o National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Estudos recentes revelam que *L.major* e *L.infantum* apresentam um cariótipo de 36 cromossomos enquanto que *L.braziliensis* possui 35 cromossomos (PEACOCK et al., 2007). As estruturas dos cromossomos de *Leishmania* são comparados as de outros protozoários, com uma região central de sequências conservadas com baixo número de cópias ou de cópia única (WINCKER et al., 1996).

Tibayrenc e Ayala (1999) em trabalho sobre evolução genética do parasito sugerem que a recombinação genética entre *Leishmanias* seria possível porém rara em condições naturais. Existem poucos relatos sobre o isolamento de cepas que foram caracterizadas como híbridos entre diferentes espécies de *Leishmania*. Estes híbridos ocorrem essencialmente entre espécies próximas, como *L.braziliensis* e *L.panamensis* ou *L.peruviana* (THOMAZ SOCCOL, 1993; BANULS et al., 1997; TORRICO et al., 1999).

GENERALIDADES

2.1. SISTEMÁTICA

As leishmanioses são infecções parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários, pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. Segundo proposta de Levine et al. (1980) este protozoário ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino Protista (HAECKEL, 1866)

Sub-Reino Protozoa (GOLDFUSS, 1817)

Filo Sarcomastigophora (HONIGBERG & BALAMUTH, 1963)

Sub-Filo Mastigophora (DEISING, 1866)

Classe Zoomastigophorea (CALKINS, 1909)

Ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963)

Sub-ordem Trypanosomatina (KENT, 1880)

Família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901)

Gênero *Leishmania* Ross, (1903)

Sub Gêneros

Leishmania Saf Janova, (1982)

Viannia Lainson e Shaw, (1987)

A nível infra-genérico Thomaz - Soccol et al. (1993 a e b) propuseram a divisão dos subgêneros em complexos filogenéticos (fig.1)

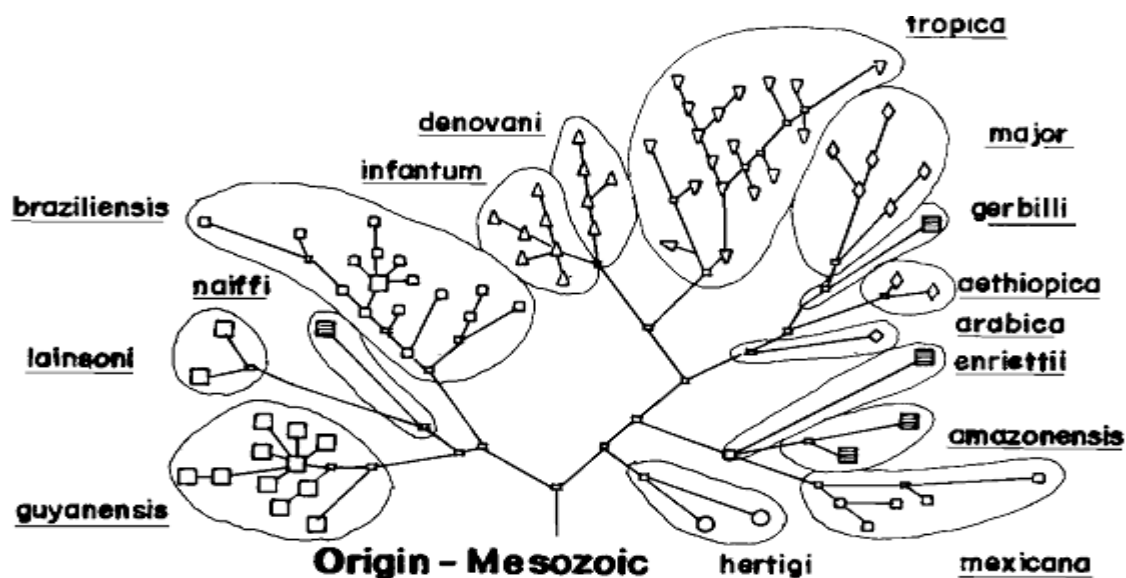


Figura 1- Cladograma mostrando a relação dos 15 complexos filogenéticos do gênero *Leishmania*, construído com base em 80 zimodemas e 13 diferentes isoenzimas, mostrando a origem monofilética do gênero.

2.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida digênico (heteroxênico), alternando entre hospedeiro vertebrado e insetos vetores. Além do homem, outros mamíferos são hospedeiros vertebrados tais como cães e alguns animais silvestres (LAINSON e SHAW, 1988).

O protozoário apresenta comportamento dimórfico, ou seja, a fase do ciclo de vida do parasita define sua forma estrutural.

A forma móvel, extracelular, flagelada, encontrada no trato intestinal do vetor é denominada promastigota (22-25µm) e a forma intracelular imóvel, é arredondada ou ovalada (4-6 µm) denominada amastigota, parasitam o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (COURA, 2005).

O desenvolvimento do protozoário no trato digestivo dos flebotomíneos é complexo e passa por diversas mudanças morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se em forma infectante para o hospedeiro mamífero (promastigota) (KILLICK-KENDRICK, 1979). Após a picada na pele as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, especialmente os macrófagos, e dentro de um vacúolo (fagossomo) se transforma em amastigotas. Essa forma intracelular se divide por divisão binária e infectam outros macrófagos. No caso das espécies viscerotrópicas ocorre então disseminação hematogênica do parasita que tem predileção pelas vísceras, como baço e fígado. O vetor, ao picar o hospedeiro vertebrado infectado ingere sangue com macrófagos contendo formas amastigotas e no trato digestivo as formas amastigotas se transformam em promastigotas completando assim o ciclo (Fig. 2) (COURA, 2005).

Somente as fêmeas do vetor são hematófagas (Fig. 3), estas se infectam no momento do repasto sanguíneo realizado em reservatórios, que podem ser o cão domiciliar, a raposa ou outro hospedeiro silvestre. O homem se infecta ao ser envolvido no ciclo do parasito (OLIVEIRA, 1997). Os vetores pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no Velho e no Novo Mundo, respectivamente. No Velho Mundo várias espécies de vetor estão envolvidas na transmissão. Já no Novo Mundo apenas *Lu. longipalpis* é capaz de transmitir o protozoário (DEANE & DEANE, 1955). Todavia, mais recentemente trabalhos relatam *Lu. cruzi* como vetor no Estado do Mato Grosso, Brasil (SANTOS et al., 1998).

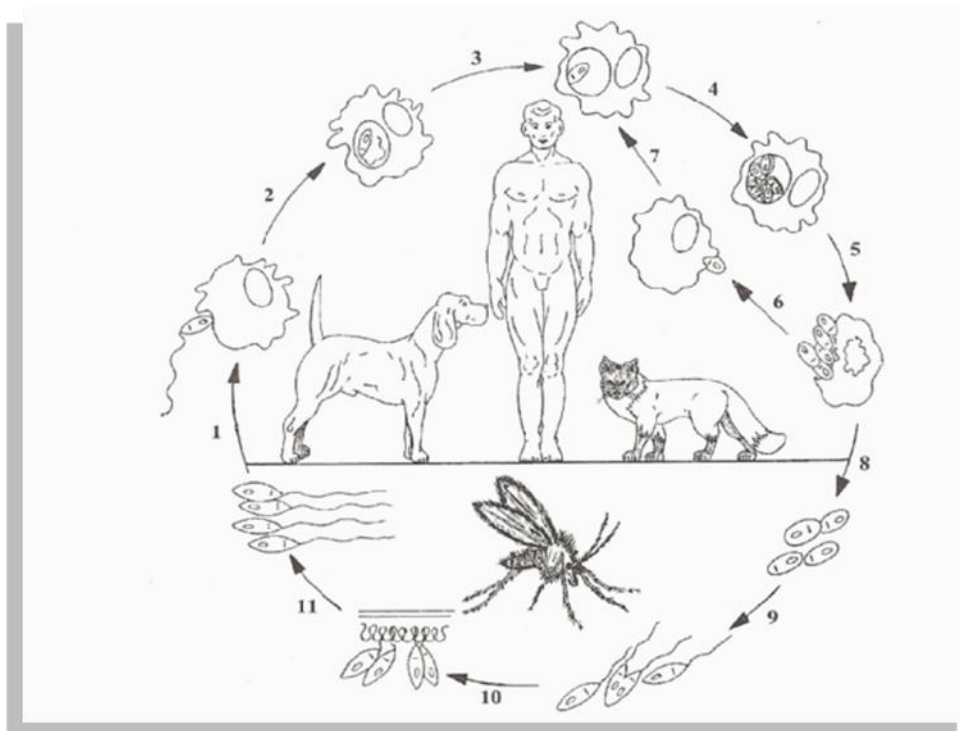


Fig 2: Ciclo de vida de *Leishmania chagasi*. 1: entrada do promastigota no hospedeiro vertebrado; 2: fagocitose do parasita pelo macrófago; 3: transformação de promastigota em amastigota; 4: multiplicação dos amastigotas no interior do macrófago; 5: lise da célula fagocitária com liberação dos amastigotas; 6: infecção de novas células; 7: perpetuação do ciclo no interior do hospedeiro vertebrado; 8: amastigotas são ingeridas pelo hospedeiro invertebrado (*Lutzomyia longipalpis*); 9: transformação de amastigotas em promastigotas; 10: maturação dos promastigotas no intestino do vetor; 11: promastigotas metacíclicas (infectantes).

Fonte – J. R. Coura, Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias (2005)



Fig.3. Fêmea do *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo Fonte - <http://www.niaid.nih.gov/newsroom/focuson>

As principais formas clínicas das leishmanioses são: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (COURA, 2005). Como o objetivo deste trabalho é a forma visceral, maior destaque será dado para ela. Para dar conhecimento das demais espécies e formas clínicas no quadro 1, estão apresentado as espécies, formas clínicas e distribuição geográfica.

ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	LESÕES CAUSADAS NO HOMEM	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
Sub Gênero <i>Viannia</i>		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
<i>L. (V.) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas	Noroeste e Norte da América do Sul até o rio Amazonas
<i>L. (V.) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L. (V.) shawi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>L. (V.) naiffi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Cutâneas e mucosas	Colômbia Panamá e Venezuela
Sub Gênero <i>Leishmania</i>		
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	América Central e norte nordeste, centro oeste sudeste e sul do Brasil.
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutâneas	Venezuela
<i>L. (L.) garnhami</i>	Predominantemente cutâneas	Andes Venezuelanos
<i>L. (L.) infantum = L. (L.) chagasi</i>	Lesões viscerais (calazar)	Sul do México ao Norte da Argentina, com predominância no Nordeste Brasileiro.
<i>L. (L.) infantum (dermotrópica)</i>	Cutâneas	Sul da Europa
<i>L. (L.) major</i>	Cutâneas	Ásia Central, Índia, Paquistão, Sul da Rússia, Oriente Médio, Norte da África.
<i>L. (L.) tropica</i>	Cutâneas	Bacia do Mediterrâneo, Sul da Europa, Norte da África, Oeste Asiático.
<i>L. (L.) aethiopica</i>	Cutânea, Cutânea difusa e Mucosa	Quênia, Etiópia, Namíbia.
<i>L. (L.) donovani</i>	LV- Calazar Indiano, dérmica pós-calazar	Ásia, (principalmente Índia, Paquistão e Bangladesh)

Quadro 1. Patologia e distribuição geográfica das leishmanioses que acomete o homem. Adaptado de (DESJEUX, 1992; KILLICK-KENDRICK & RIOUX, 2002; SHAW, 2002; PRATLONG & DEDET, 2003, DEDET, 2009).

2.3. LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNDO, NAS AMÉRICAS E NO BRASIL.

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas e permanecem como um grave problema de Saúde Pública para o qual a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem dirigido especial atenção. Este grupo de doenças é importante em termos de morbidade e, em alguns casos graves, de mortalidade (DEDET, 2009).

Encontrada essencialmente em países tropicais e sub-tropicais, existe uma grande preocupação quanto ao número de casos de LV, pois chegam a 500.000 casos/ano, com prevalência de 12 milhões em todo o mundo. Segundo a OMS é bastante difícil ter estimativas da incidência e prevalência corretas em todo o Mundo, uma vez que os casos reportados são geralmente inferiores aos que realmente ocorrem. Dos 88 países acometido pela doença, 13 são considerados sub desenvolvidos, principalmente de áreas rurais pobres e 72 são países desenvolvidos (DESJEUX, 2004; OMS, 2008). (Fig.4a)



Fig. 4a- Distribuição geográfica da leishmaniose visceral. Fonte- Organização Mundial de Saúde (2008)

A epidemiologia das leishmanioses é complexa, pois existem cerca de 30 grupos taxonômicos de *Leishmania*, sendo que 19 infectam o homem podendo causar doenças. A quantidade de vetores é igualmente abrangente chegando a 80 espécies e subespécies de dípteros flebotomíneos descritos (KILLICK-KENDRICK & RIOUX, 2002) (Quadro 1).

Na África oriental e Índia a LV é causada por *L.donovani*, já na Etiópia e Sudão o agente etiológico é *L.archibaldi* (PRATLONG et al., 2001). No sudoeste da Europa e Bacia Mediterrânea a LV tem como agente etiológico *L.infantum* e, no Novo Mundo, *L. chagasi* (DESJEUX, 2004).

Dos países da América Latina, a doença já foi descrita em 12 países sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, (COURA, 2005, MADEIRA 2009).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, dos 27 estados 21 tem registros de casos com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, sendo a região Nordeste a com maior prevalência. Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a peri urbanização e urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), e mais recentemente os municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (MS, 2006) Fig.4b.

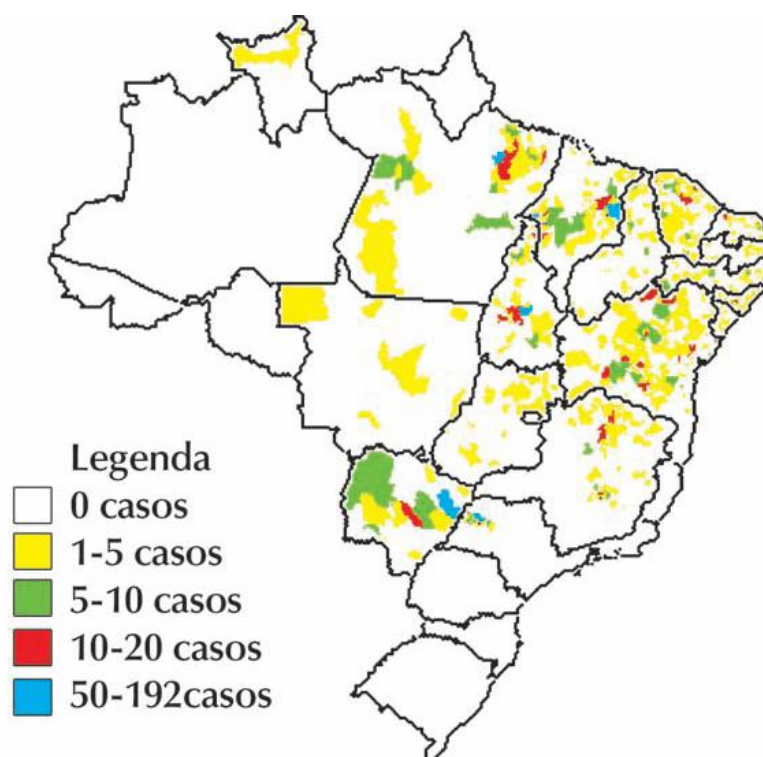


Fig.4b Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral no Brasil. Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS

2.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania*

Como o parasito é estruturalmente similar tanto nas formas amastigostas quanto promastigotas é impossível a identificação por técnicas microscópicas, sendo utilizado caracteres extrínsecos para nominar espécie ou para a classificação das mesmas dentro do gênero. Somente a partir dos anos 80 com a utilização de isoenzimas e depois com as técnicas moleculares foi possível usar caracteres intrínsecos na identificação do parasito.

2.5. ISOENZIMAS

Graças a esta metodologia foi possível organizar a classificação para o gênero (THOMAZ-SOCCOL, 1993 a e b) e tem a vantagem de permitir identificar as espécies do parasito. Ela é considerada técnica padrão ouro para a identificação das espécies segundo a OMS (WHO, 1990, DEDET, 2009). Todavia, necessita-se primeiro isolar o parasito para sua posterior identificação, o que leva tempo e pode haver contaminações e perdas.

Assim, nos anos 90 com o desenvolvimento das técnicas moleculares outras técnicas vêm sendo empregadas para dar o diagnóstico já com a identificação da espécie.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO GERAL

Estudar, por técnicas moleculares, a variabilidade genética inter e intra-específica de *L. chagasi* e *L. infantum* isolados de cães e humanos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar 20 cepas de *Leishmania* procedentes de indivíduos com LV (cães e humanos) de diferentes regiões do Brasil.
- Analisar o polimorfismo de DNA por RAPD em amostras de *L. infantum* e *L. chagasi* provenientes de diferentes regiões do Brasil.
- Avaliar o polimorfismo do gene K26 de cepas de *Leishmania infantum* e *L. chagasi* por RFLP-PCR.
- Comparar os isolados de *Leishmania* sp. do Brasil e da Europa por sequenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

Dezenoves cães provenientes de diferentes localidades do Brasil com suspeita clínica de leishmaniose visceral foram avaliados clinicamente adotando-se a classificação de Abranches et al. (1991) modificada por Molina et al. (1994). Em proprietários de cães com exame parasitológico positivo foi colhido sangue para pesquisa do parasito.

4.1 EXAMES COMPLEMENTARES DOS CÃES

Dos cães submetidos ao exame clínico, foram coletados 5mL de sangue, sendo 2mL colhidos com anticoagulante (EDTA) para realização de hemocultura, (DEREURE et al., 1998), hemograma (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994), os outros 3mL foram colhidos sem anticoagulante para pesquisa de anticorpos (reação de imunofluorescência indireta – RIFI e reação de enzima imunoensaio - ELISA). Avaliações de função hepática e renal foram feitas pelas dosagens ALT - PP (ANALISA) e método cinético UV; FA - ACP - 405 (WEINER LAB.) método cinético otimizado - 405 nm; creatinina K (LAB TEST) método cinético otimizado e Uréia CE (LAB TEST) método enzimático colorimético. Todos os métodos foram realizados segundo recomendações dos fabricantes.

4.2 SOROLOGIA

A determinação dos títulos dos anticorpos (IgG) contra *Leishmania* foi realizada pelas técnicas de RIFI, empregando-se conjugado anti-IgG de cão (isotiocianato de fluoresceína – Sigma) e o ELISA, utilizando-se conjugado anti-IgG de cão (peroxidase – Sigma), padronizados conforme Castro, Thomaz-Soccol & Augur (2003). Títulos iguais ou superiores a 1:40 foram considerados positivos para a RIFI, e o ponto de corte para a reação de ELISA foi considerado de 0,135, valor este que representa a média dos valores de absorbância dos animais negativos (nascidos em Curitiba) mais dois desvios-padrão, repetidos em cada placa.

4.3 ISOLADOS

Os cães com sintomatologia compatível com leishmaniose visceral provenientes de áreas endêmicas do Brasil, foram submetidos a punção aspirativa do linfonodo e/ou punção venosa, para o isolamento do parasito. Em humanos a coleta de material foi realizada apenas por punção venosa. Antes da coleta, cada paciente foi consultado e preencheu o termo de livre consentimento exigido pelo Comitê de Ética e concordou com a pesquisa (certificado no. 125). Também preencheram um questionário epidemiológico.

Para isolamento do parasito, o material proveniente de punção venosa foi centrifugado (1.500 g por cinco minutos). Em seguida colhida a camada leucocitária com auxílio de pipeta Pasteur e inoculado em meio de cultura NNN (Novy, McNeal e Nicolle) ou Tobbie e Evans. As culturas foram repicadas a cada sete dias para novos tubos até o isolamento da *Leishmania*.

Depois de confirmado, por microscopia o isolamento do parasita, a amostra recebia uma denominação e era congelada e mantida em nitrogênio líquido para posterior identificação e estudo de variabilidade genética. Para obter maior quantidade do parasito, para ser usado nas etapas de identificação e estudo de variabilidade genética foi feito cultura dos isolados em meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 5%. A biomassa de parasitos foi obtida a partir do conteúdo de quatro tubos de 15mL contendo meio NNN que foram passados para tubos de falcon (15mL) contendo 5mL de meio RPMI com 5% de soro fetal. Os tubos eram observados semanalmente e quando ricos em *Leishmania* e livres de contaminações eram passados para garrafa de cultivo celular contendo 10mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após sete dias o conteúdo da garrafa era transferido para um tubo Falcon de 15mL com solução de NaCl2 a 0,3% e centrifugado durante 10 minutos a 3.500g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi centrifugado com solução de NaCl2 a 0,3%, por 10 minutos a 3.500g a 4°C. Depois foi retirado o sobrenadante e o precipitado foi transferido para um tubo de 2mL previamente pesado e esterilizado. O conteúdo foi centrifugado a 9.000g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi estocada no freezer -20°C até o momento da extração do DNA.

4.4 CEPAS REFERÊNCIAS DE *Leishmania*

As amostras referências usadas no presente trabalho como controles positivos para as técnicas moleculares, seguiram as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), sendo: *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/FR/71/LRM75); *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300) e *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Estas são criopreservadas no Laboratório de Parasitologia Molecular (UFPR) tendo sido descongeladas, repicadas semanalmente e cultivadas como os isolados para as etapas de extração de DNA. As amostras foram doadas pelo Laboratório de Ecologia Médica (LEM) de Montpellier, França. A escolha das três espécies foi devido ao fato delas apresentarem maior distribuição geográfica no Brasil.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As extrações de DNA das amostras foram feitas de acordo com o protocolo segundo BANULS (1998), com modificações.

Num tubo do tipo “eppendorf” de 2mL que continha a biomassa de *Leishmania*, foram adicionados 300µL de tampão de Lise (Tris-HCl 10Mm, EDTA 1.0Mm pH 8,0), 50 µL de SDS a 1% e 5µL de Proteinase K, homogenizado e incubado em banho-maria durante 5 horas a 56°C. Após este período foi feita a inativação da Proteinase por 5 minutos a 90°C. Em seguida foi adicionado 5µL de RNase, homogeneizado e incubado em banho-maria por 1 hora e trinta minutos à 37°C.

Para desproteínização das células foi feito a extração com fenol saturado e clorofórmio. Foi adicionado 400µL de fenol homogeneizou por um minuto e centrifugado a 12.000g por 5 minutos a 20°C. Recuperou-se o sobrenadante em outro tubo e adicionado 400µL de uma mistura (25:24:1) de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto e centrifugadas a 12.000g por 5 minutos a 20°C. A fase superior foi recuperada, fez-se uma nova extração co

m fenol-clorofórmio álcool-isoamílico. Após a recuperação da fase superior, foi adicionado 400µL de clorofórmio, homogeneizado por 1 minuto e centrifugado a 12.000g por 5 minutos a 20°C. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado com 30µL de acetato de sódio 3M 10% e 600µL de etanol

absoluto a 4°C. Este material foi centrifugado a 12.000g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado recuperado e lavado com 300µL de etanol 70% e centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e os tubos abertos foram colocados em estufa a 37°C até secarem por completo.

Após isto o DNA foi ressuspendido em 100µL de TE (Tris-HCl 10Mm, EDTA 1.0Mm, pH 8,0), e permaneceu a 4°C “overnight”. Posteriormente foi feita uma alíquota para as análises e o restante foi mantido a -80°C como solução estoque.

As quantificações de DNA dos isolados foram feitas pela medida de absorbância de 260 nm a 280 nm em espectrofotômetro (Gene Quant®).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para identificar os isolados por PCR, foram usados os iniciadores RV1 e RV2 desenhados com base no DNA alvo altamente repetitivo do minicírculo do kDNA de *Leishmania donovani sensu lato*, segundo metodologia descrita por Lachaud et al. (2002). Para reação de 25µL, utilizou-se 2,5µL de tampão 0,5µL de iniciadores RV1/RV2, 1,0µL de dNTP, 1,5µL de MgCl₂, 0,3µL de Taq polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5µL de DNA (40ng/mL). Os ciclos utilizados foram: desnaturação inicial de 94°C por 4min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 59°C por 30s, 72°C por 30s e uma extensão final de 10 min a 72°C.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' → 3')	ESPÉCIE DE <i>LEISHMANIA</i>	REFERÊNCIA
RV1	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAG	<i>L.(L)infantum</i>	Lachaud et al.,2002
RV2	CCACCTGGCCTATTTTACACCA		
K26r	ACGAAGGACTCCGCAAAG	<i>L.(L)donovani</i>	Haralambus et al.,2008
K26f	TTCCCATCGTTTTGCTG		

Para o realização dos estudos com os iniciadores K26 em reação de 25µL, utilizou-se 2,5µL de tampão, 1,0µL de iniciadores K26r/K26f, 2,0µL de dNTP, 1,25µL de MgCl₂, 0,25 µL de 0,1% Triton x 100, 0,1µL de Taq polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µL de DNA. Os ciclos utilizados foram 94°C por 5min, 35 vezes de 95°C por 1 min, 48°C por 1 min, 72°C por 1 min e 7 min a 72°C.

As amostras amplificadas para estes iniciadores foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,6%, em tampão Tris-EDTA-Acetato (TAE) 1X pH 8,0 (SAMBROOK et al., 1989). Para visualização das bandas, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µL/mL) observados sob a luz ultravioleta e fotografados.

4.7 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPD)

O RAPD é uma técnica que apresenta vantagens, pois é simples, rápida e não necessita de conhecimento prévio do genoma, e tem sido utilizada para estudo de variabilidade genética intra e interespecífica em *Leishmania*, incluindo aquelas do complexo *Leishmania donovani* (GUERBOURJ et al., 2001; MAURÍCIO et al., 2001).. Baseado nesses dados, a técnica foi escolhida para estudar a variabilidade genética das amostras, utilizando os iniciadores randômicos (OPA3, OPA9, OPA10) que analisaram regiões complementares, aleatoriamente no genoma de *Leishmania* sp.

Os iniciadores utilizados para amplificação ao acaso dos fragmentos de DNA estão descritos abaixo.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' _ 3')	REFERÊNCIA
Iniciador A3	AGTCAGCCAC	BAÑULS et al., 1998
Iniciador A9	GGGTAACGCC	BAÑULS et al., 1998
Iniciador A10	GTGATCGCAG	BAÑULS et al., 1998

As reações de amplificação para o RAPD foram feitas em volume de 25 µL contendo 10ng de DNA genômico, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (deoxinucleotídeos trifosfatos), 10 pmol do iniciador e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Os ciclos de amplificação consistiram de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, desnaturação de 94°C por 1 min, 20 anelamento de 36°C por 1 min e extensão de 72°C

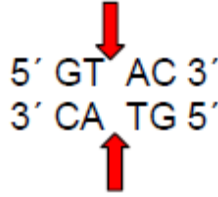
por 2 min, por 45 ciclos. E uma extensão final de 72°C por 7 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,6% e visualizadas por luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (SAMBROOK et al., 1989).

4.8 ANÁLISE FENÉTICA

Para tabulação de dados obtidos pela técnica de RAPD, optou-se pela leitura automatizada do padrão de bandas dos géis usando o software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics) ajustados para 95% de sensibilidade. Foram examinadas apenas bandas que apresentavam repetibilidade. O padrão de gel foi automaticamente convertido em uma matriz binária. A distância entre as amostras foi avaliada através do coeficiente de Jaccard gerado através do software FAMD (MILLER, 1997; SCHLÜTER & HARRIS, 2006).

4.9 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO - RFLP-PCR

A análise de polimorfismo a partir de fragmentos de restrição do kDNA é considerada um instrumento para estudos epidemiológicos e de a variabilidade genética em amostras de *Leishmania* (BARKER & ARNOT, 1981; PACHECO et al., 1999). Para digestão do fragmento de 970 e 1295 pb do kDNA, proveniente da PCR com o iniciador K26, foi utilizado a endonuclease de restrição *RsaI* (Quadro 2). As reações foram realizadas em um volume final de 20µL, contendo 2µL do produto da PCR descrita no item 4.7, 1µL da enzima (10U) e 4µL do tampão correspondente, incubando-as por 4 horas a 37°C, de acordo com o protocolo do laboratório de Parasitologia Molecular UFPR. Os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,6% e corado com brometo de etídeo e devidamente fotografado.

ENZIMA	SÍTIO DE RECONHECIMENTO
<i>Rsa</i> I	

Quadro 2 - Endonuclease de restrição utilizada na PCR-RFLP

4.10 SEQUENCIAMENTO

Das amostras amplificadas para o gene K26 268, 372 e 362, apresentaram polimorfismo, exibindo três perfis de bandas com pesos moleculares de 970pb, 1295pb e banda dupla de 970/1295pb.

Inicialmente foi realizada a amplificação do gene pelos iniciadores K26r e K26f como descrito previamente. Após amplificação, as reações de sequenciamento foram realizadas segundo método padronizado no laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR. As reações foram processadas em tubos do tipo “eppendorf” de 2,0mL contendo 1,6 pmol/μ dos primers K26f e K26r 1,0μL do Big Dye Terminator, 1,0μL do tampão próprio da reação, 50ng de DNA, água ultrapura suficiente para completar o volume de 10 μL. As reações foram realizadas com desnaturação inicial a 96°C por 1 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96°C a 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Em seguida o produto da reação de sequenciamento foi submetido a precipitação com isopropanol a 70%, incubado em temperatura ambiente por 20minutos e, centrifugadas a 4.000g por 25 minutos. Ao término da centrifugação o isopropanol foi removido por inversão dos tubos e adicionado 400 μL de etanol a 80% e centrifugado por 5 minutos a 4.000g. O etanol foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pipeta e as amostras foram deixadas em repouso para secar em estufa a 37°C até que todos os tubos estivessem completamente secos. O DNA foi ressuscitado em 10 μL de formamida HI-DI. O material foi então submetido ao sequenciamento.

4.11 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS

As sequências consensos do gene K26 foram geradas a partir do programa EMBOSS GUI (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS>) e submetidas ao programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação dos resultados.

Sequências de *L. infantum* depositadas no Genbank sob o código MHOM/FR/1978 e MHOM/FR/1995 provenientes da França e, MHOM/GR/2001 da Grécia, foram utilizadas para análise de distância genética entre as amostras obtidas no Brasil.

Todas as sequências foram manualmente alinhadas no programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997) e analisadas no programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” v. 4.1 (TAMURA, DUDLEY, NEI e KUMAR 2007) para a construção da árvore filogenética.

RESULTADOS

5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Leishmania*

Vinte e sete animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral e os mais frequentes foram: onicogrifose (94,8%), linfadenomegalia (82,8%), caquexia (57,57%), alopecia (65,45%), descamação furfurácea (63,36%), úlceras (40,2%) e palidez de mucosa oral e conjuntival. Um animal apresentou lesão de mucosa nasal. Na classificação de acordo com os sinais clínicos se verificou que 62% dos animais eram polissintomáticos, 18% oligossintomáticos e 20% assintomáticos. Vale ressaltar que quando um animal apresentou resultado positivo para o cultivo do parasito todos os demais cães da mesma residência eram examinados e o material era colhido para exame, o que justifica o encontro de 20% de animais positivos e assintomáticos.

Observou-se que 40% dos animais apresentaram anemia com o número de eritrócitos variando de 4,20 a 4,76 milhões por mm³. Em 50% dos casos, a anemia era normocítica hipocrômica. Leucocitose associada à neutrofilia foi constatada em 52% dos casos, linfocitose em 65% e eosinofilia em 15,62%. A concentração de proteína plasmática variou de 8,6 a 10,8 g.dL⁻¹. Os níveis de AST e ALT apresentaram-se moderadamente alterados com $43,0 \pm 17,2$ e $25,5 \pm 3,2$ respectivamente. Uréia ficou dentro dos valores de referência em 68% dos casos.

Noventa e dois por cento dos animais apresentaram sorologia positiva em ambas as técnicas usadas. Na RIFI, os títulos variaram de 1:40 a 1:2560. No teste de ELISA, as absorbâncias variaram de 0,139 a 1,640. Métodos sorológicos são excelentes para triagem em leishmaniose visceral. Todavia, o exame parasitológico é indispensável para a confirmação da espécie sob estudo.

O cultivo de *Leishmania* foi positivo para 19 cães e 1 humano (Quadro 3) os outros cães tiveram diagnóstico confirmado para outras etiologias, como erlichiose, demodicose.

Os isolados obtidos em cultura estavam na forma promastigota e estruturalmente são iguais o que não permite identificar a espécie. Assim, para identificação do parasita após cultura, e extração de DNA, os mesmos foram submetidos a PCR com os iniciadores RV1 e RV2, que permitiu amplificar fragmentos de 145pb em comparação com a cepa referência, caracterizando como *L.(L.) infantum* (Fig.6)

Quadro 3 – Dados dos isolados com suas procedências e resultados dos exames sorológicos e de PCR para diagnóstico da leishmaniose visceral.

Código		Procedência	Exames realizados		
Cepa		Local de origem/local de notificação	IFI	ELISA	PCR/ RV1/RV2
189	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
193	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
210	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
211	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
240	Cão	Fortaleza (CE)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
268	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
269	Cão	Belo Horizonte (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
284	Cão	Desconhecida /Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
362	Cão	Aracaju (SE)/Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
363	Cão	Três Corações (MG)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
367	Cão	Bauru (SP)	+	+	<i>L.i</i>
368	Cão	Bauru (SP)	+	+	<i>L.i</i>
369	Cão	Bauru (SP)	+	+	<i>L.i</i>
372	Cão	Três Lagoas (MS)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
375	Humano	Três Lagoas (MS)/Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
376	Cão	Campo Grande (MS)/Curitiba Vacinado	+	+	<i>L.i</i>
383	Cão	Tocantins (TO)/Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
391	Cão	Campo Grande (MS)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
392	Cão	Campo Grande (MS)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>
402	Cão	Mato Grosso (MT)/ Curitiba	+	+	<i>L.i</i>

Estes isolados foram usados para identificação e estudo de variabilidade infra específica por RAPD, RFLP-PCR e sequenciamento.

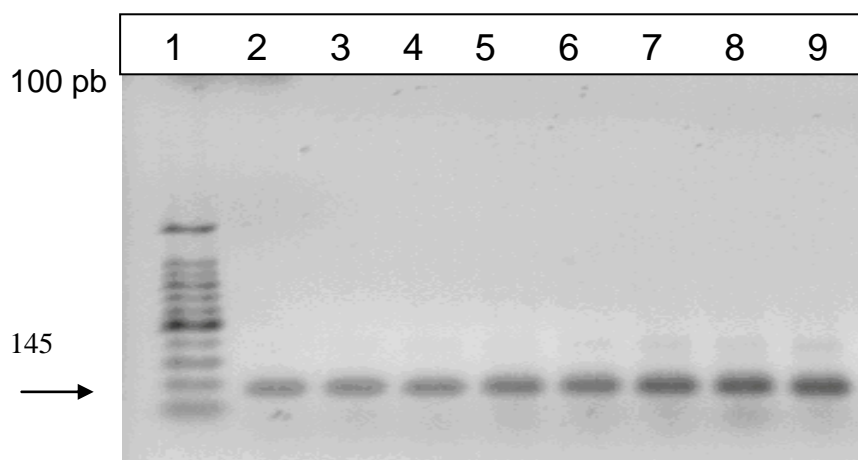


Figura 6. Eletroforese mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR dos isolados de *Leishmania* usando como iniciadores RV1 e RV2. 1: Marcador Molecular 100pb; 2: CUR189; 3: CUR193; 4: CUR210; 5: CUR211; 6: CUR240; 7: CUR268; 8: CUR269; 9: Cepa referência *L. (L.) infantum*.

5.1 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPD)

Vinte isolados e a cepa referência de *L.infantum* foram avaliados com três iniciadores (A3, A9, A10) amplificaram vários segmentos de DNA. Cada iniciador anela em uma sequência alvo de nucleotídeos diferente no DNA, como os polimorfismos detectados estão geralmente presentes em diferentes regiões no genoma, a utilização de três iniciadores torna-se muito mais abrangente.

Pela análise dos perfis foi possível identificar diferenças entre os isolados quer seja pela presença ou ausência de um ou vários fragmentos amplificados. Algumas bandas foram bastantes características enquanto outras apresentavam polimorfismo.

A variabilidade genética oscilou em função do iniciador e da procedência da amostra. Para o iniciador A3 os isolados de Minas Gerais (CUR268, CUR269, CUR363) e, Ceará (CUR240) foram os mais polimórficos. As mesmas não apresentaram recorrências com os demais isolados. Entretanto, pode-se observar que as amostras de Minas Gerais CUR189, CUR193, CUR210, CUR211 apresentaram menor polimorfismo (Figs. 7a e b).

Para o iniciador A9, dois a quatro marcadores estiveram presentes em todos os isolados inclusive na cepa referência de *L.infantum*. A amostra CUR240 proveniente de um cão do Ceará se mostrou mais polimórfico, apresentando apenas um marcador comum aos demais isolados para este iniciador, as amostras CUR363, CUR368, CUR383 e CUR391 foram semelhantes mesmo não tendo relação com a origem geográfica das amostras (Figs. 8a e b).

Para o iniciador A10, de um a dois marcadores foram recorrente para a cepa referência de *L.infantum*, as amostras CUR189, CUR193, CUR210, CUR268, CUR362 e CUR376 apresentaram marcadores comuns sendo que as amostras CUR189, CUR193, CUR210, CUR268 são proveniente de Minas Gerais, apresentando relação das amostras com a origem geográfica, as demais amostras se apresentaram polimórficas entre os isolados do Brasil (Figs 9 a e b).

Todos os 20 isolados foram amplificados para os três iniciadores A3, A9 e A10 e apresentaram um bom padrão de amplificação e uma boa resolução, a variabilidade intra-específica de *L.infantum* ficou muito bem demonstrada, com vários segmentos

polimórficos apresentadas nos três iniciadores, sendo as figuras 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, exemplo da identificação destes iniciadores.

Todos os iniciadores apresentaram alto polimorfismo, quando aplicados as amostras de várias regiões do Brasil (SP, MG, MS, MT, TO, SE e CE).

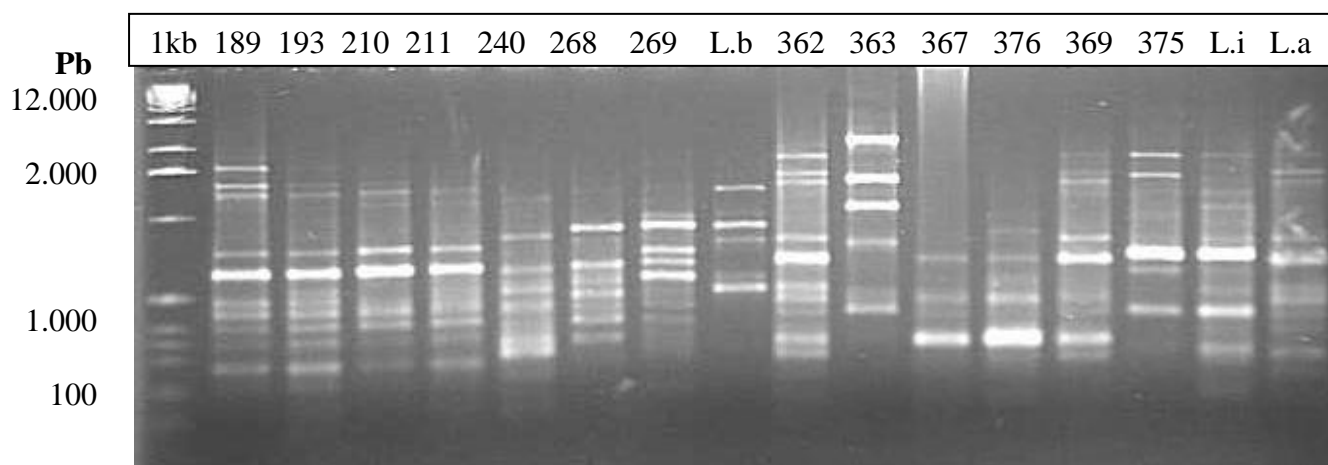


Figura 7a. RAPD dos isolados com o iniciador A3. Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

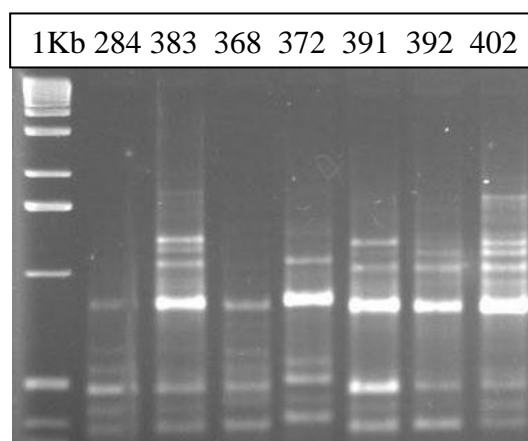


Figura 7b. RAPD dos isolados com o iniciador A3. Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

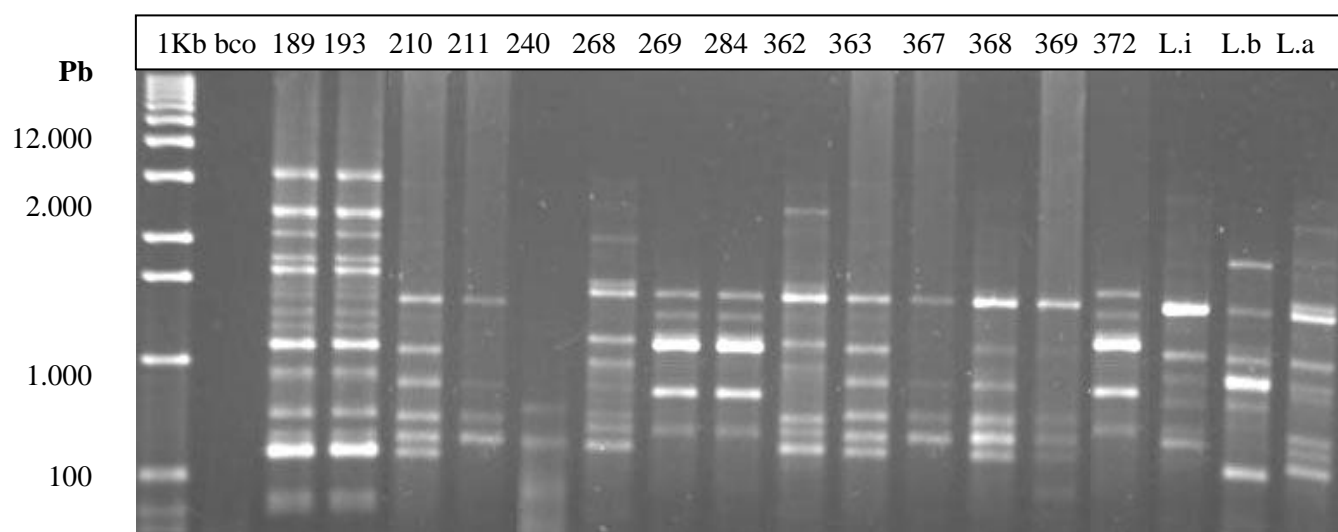


Figura 8a. RAPD dos isolados com o iniciador A9. Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

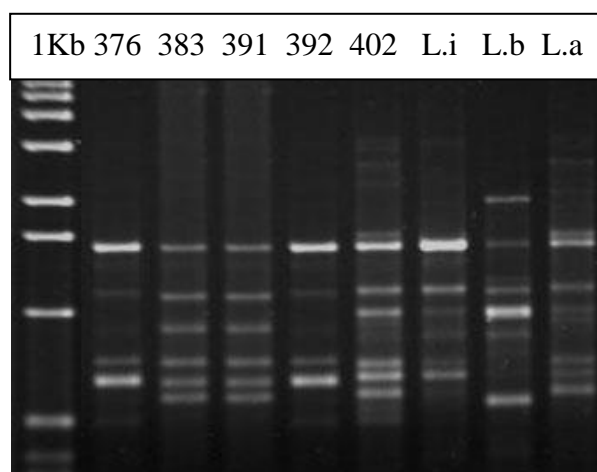


Figura 8b. RAPD dos isolados com o iniciador A9. Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

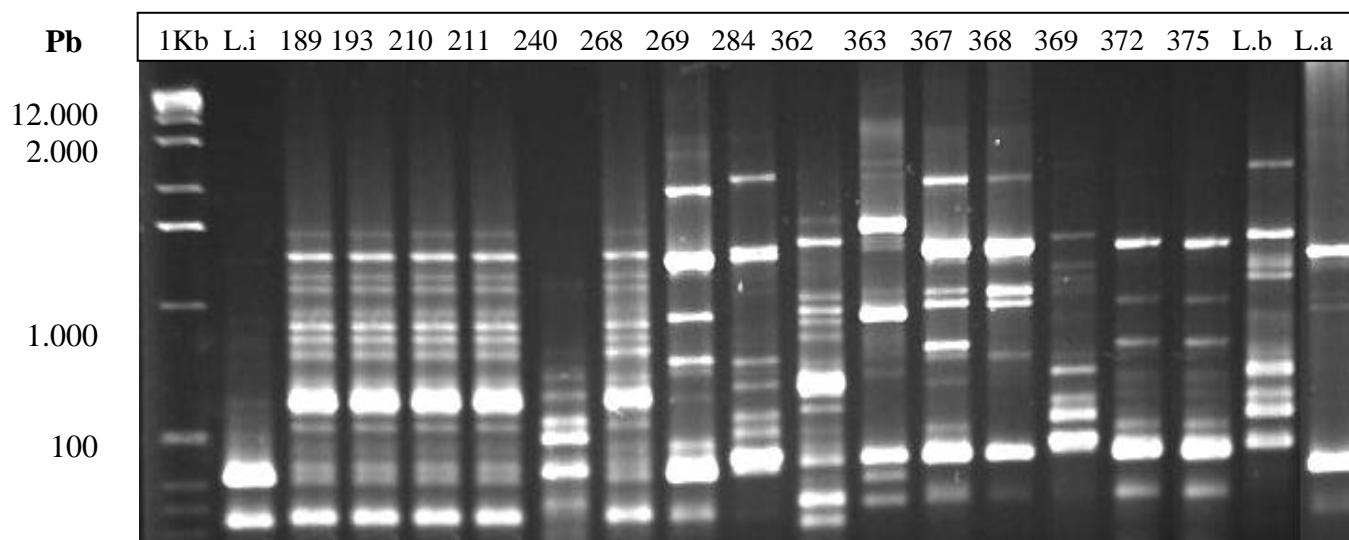


Figura 9a. RAPD dos isolados com o iniciador A9, Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

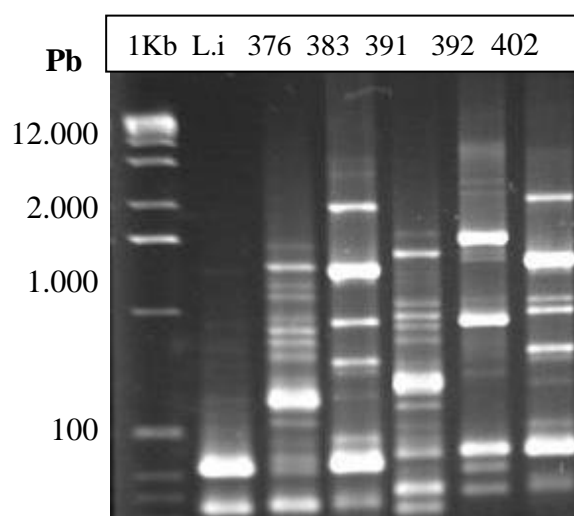


Figura 9b. RAPD dos isolados com o iniciador A9., Marcador Molecular 1Kb. Eletroforese em gel de agarose 1,6%.

A análise dos padrões de bandas permitiu a construção do fenograma utilizando o índice de Jaccard, árvore não enraizada e filograma usando o índice de Nei-Li.

Quando usado o índice de Jaccard verificou-se que *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300) aparece em um ramo distinto enquanto que *Leishmania* do sub Gênero *Leishmania* como *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) se agrupou em outro ramo. A cepa referência de *L.(L.) infantum* e as amostras de diferentes regiões do País se agruparam em outro ramo distinto. Neste fenograma se observa uma clara divisão dos isolados por região. Isolados provenientes de animais de Minas Gerais e de São Paulo, que fazem parte da região sudeste se agruparam em ramos muito próximos. Já os isolados do parasito que vieram da região Centro Oeste, na qual se encontram os isolados dos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (o estado do Tocantins antes da divisão do estado em 1988 fazia parte da região do Centro Oeste), se agruparam. As amostras do Município de Três Lagoas (MS) CUR372 e CUR 375 provenientes de cão e humano, respectivamente, se agruparam em um ramo próximo, demonstrando fluxo gênico do parasita entre homem e o cão.

Os resultados obtidos com a árvore não enraizada, pelo coeficiente de Nei e Li' e coeficiente de Jaccard apresentaram agrupamento de acordo com a origem geográfica, exceto as procedentes do Ceará (CUR240), Minas Gerais (CUR363), Tocantins (CUR383), Mato Grosso do Sul (CUR376), Mato Grosso (CUR402) e Sergipe (CUR362).

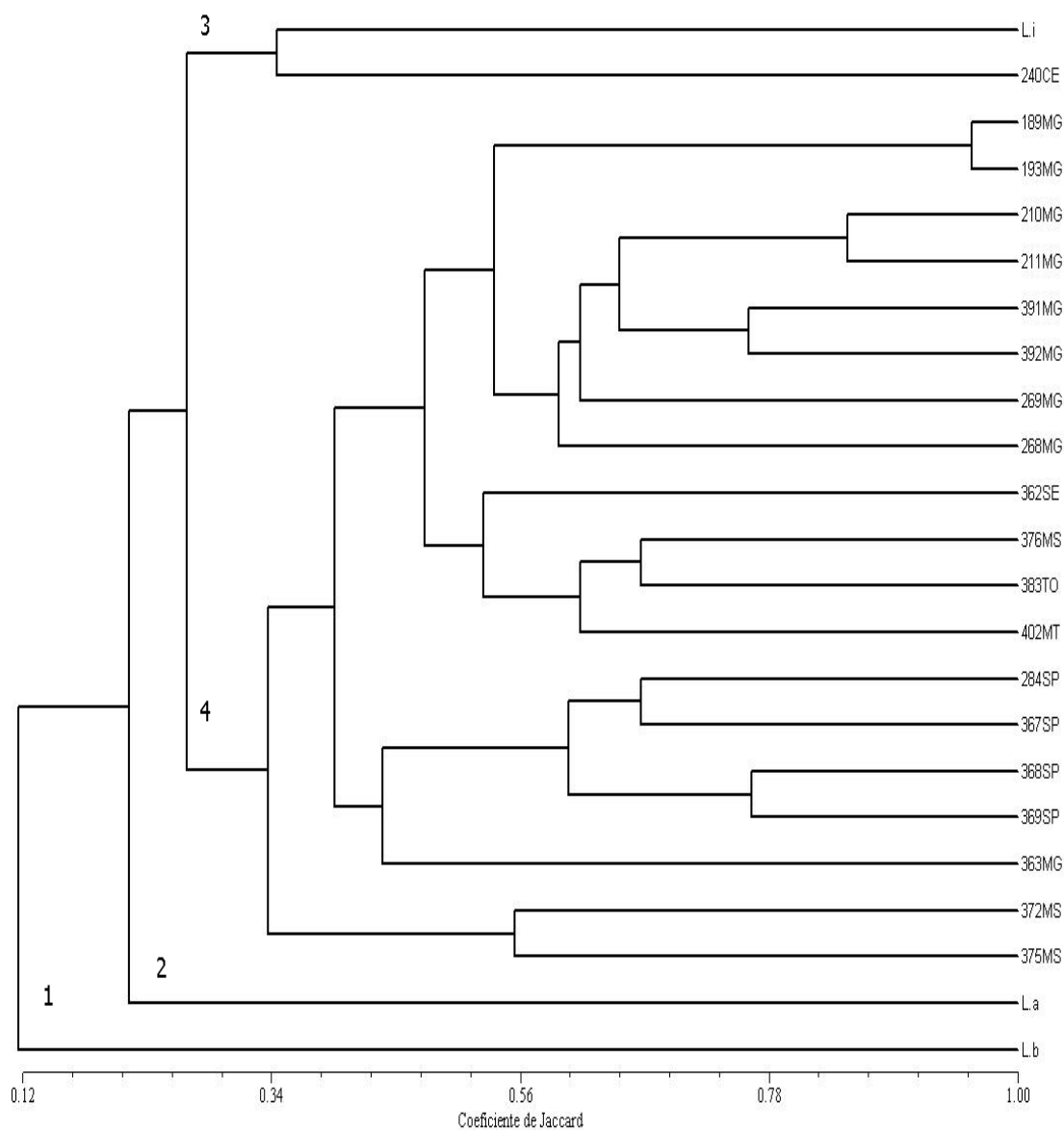


Figura 10 –Fenograma dos isolados e cepas referência de *Leishmania* gerado pelo programa UPGMA com agrupamento pelo **coeficiente de Jaccard**, a partir de eletroforeses de RAPD realizadas com três iniciadores (A3, A9 e A10). Os isolados estão indicados de acordo com o número de entrada no Laboratório de Parasitologia Molecular (LPM) da UFPR. As cepas de referência: *L.(L.)infantum* MHOM/FR/71/LRM75 (*L.i*); *L.(L.)amazonensis* MHOMBR/73/M2269 (*L.a*) e *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/00/LTB300 (*L.b*).

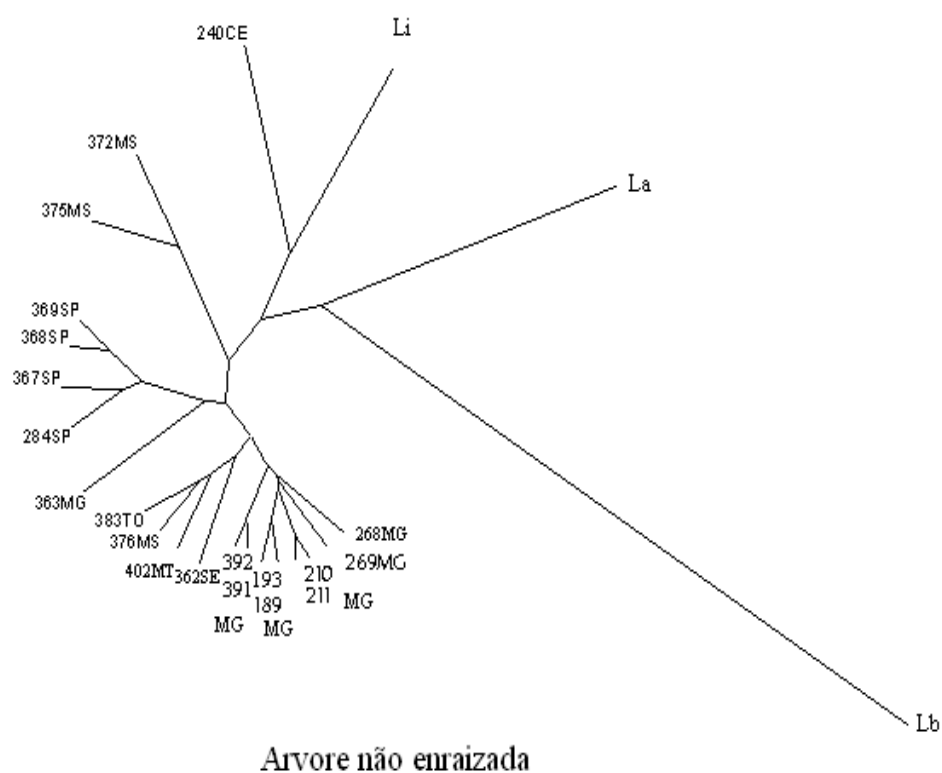


Figura 11 –Arvore não enraizada, a partir de eletroforeses de RAPD realizadas com três iniciadores (A3, A9 e A10). Os isolados estão indicados de acordo com o número de entrada no Laboratório de Parasitologia Molecular (LPM) da UFPR. As cepas de referência: *L.(L.)infantum* MHOM/FR/71/LRM75 (*L.i*); *L.(L.)amazonensis* MHOMBR/73/M2269 (*L.a*) e *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/00/LTB300 (*L.b*).

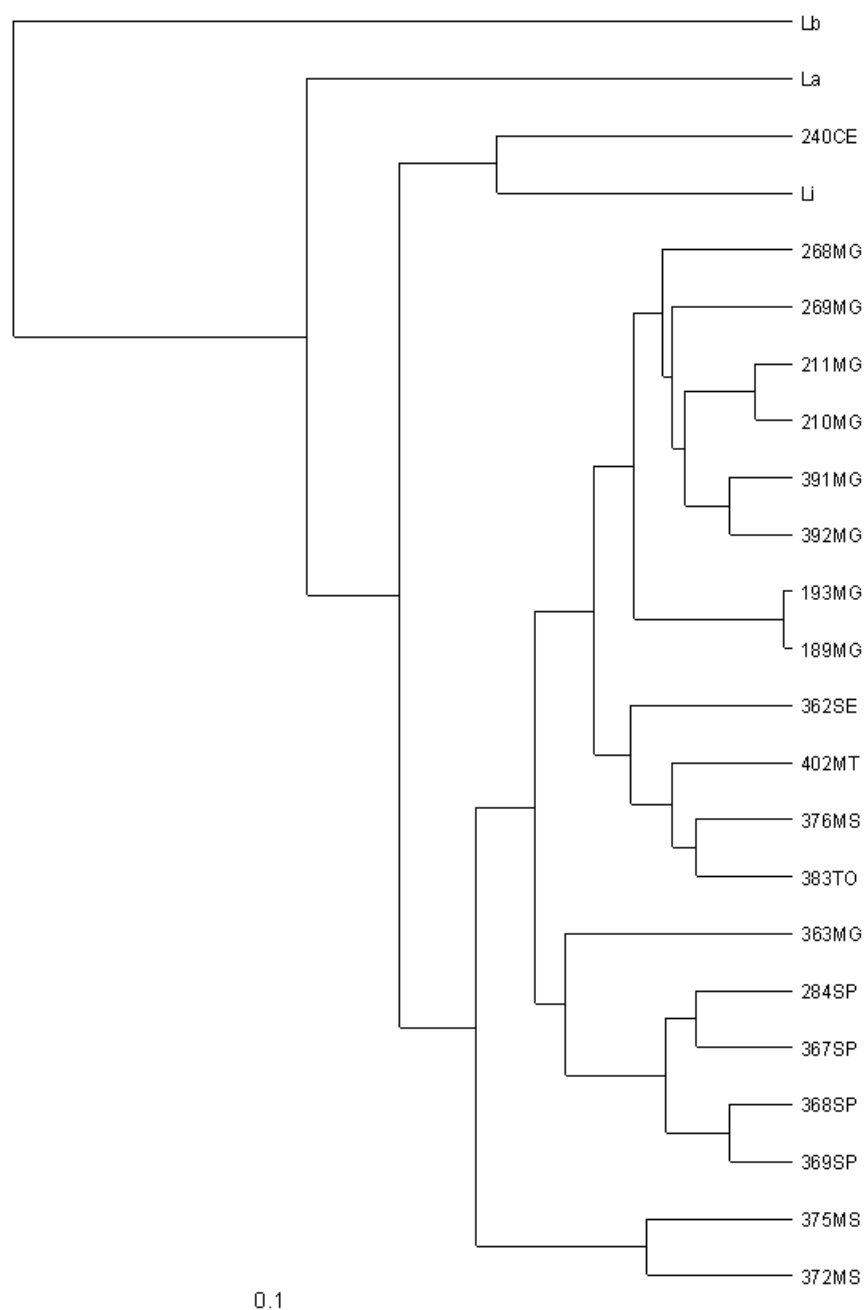


Figura 12 –Filograma de Nei-li dos isolados e cepas referência de *Leishmania*, a partir de eletroforeses de RAPD realizadas com três iniciadores (A3, A9 e A10). Os isolados estão indicados de acordo com o número de entrada no Laboratório de Parasitologia Molecular (LPM) da UFPR. As cepas de referência: *L.(L.)infantum* MHOM/FR/71/LRM75 (*L.i*); *L.(L.)amazonensis* MHOMBR/73/M2269 (*L.a*) e *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/00/LTB300 (*L.b*).

5.2 PCR COM INICIADOR K26

O grupo de referência no estudo de Leishmaniose de Montpellier coordenado pelo Dr Jean Pierre Dedet desenvolveu um método molecular por RFLP/PCR do gene K26 para discriminar zimodemas *L.donovani* e *L.infantum* (HARALAMBOUS et al., 2008) sendo possível separar várias linhagens de *L.infantum* do zimodema MON 1. O iniciador K26 é específico para complexo *Leishmania donovani*, não amplificando para outras espécies de *Leishmania* (Fig.13). Assim, mostrou-se um bom marcador para estudar os casos de leishmaniose visceral.

Quando o DNA dos isolados de áreas endêmicas do Brasil foram amplificados com este marcador observou-se que estes apresentaram polimorfismo sendo que 10% apresentaram dupla banda, 15% apresentaram fragmentos com 1295pb, já 75% dos isolados e a cepa referência de *L.infantum* apresentaram fragmentos de 970pb, este polimorfismo se dá, porque a região K26 é altamente polimórfica (HARALAMBOUS et al., 2008) (Fig.14).

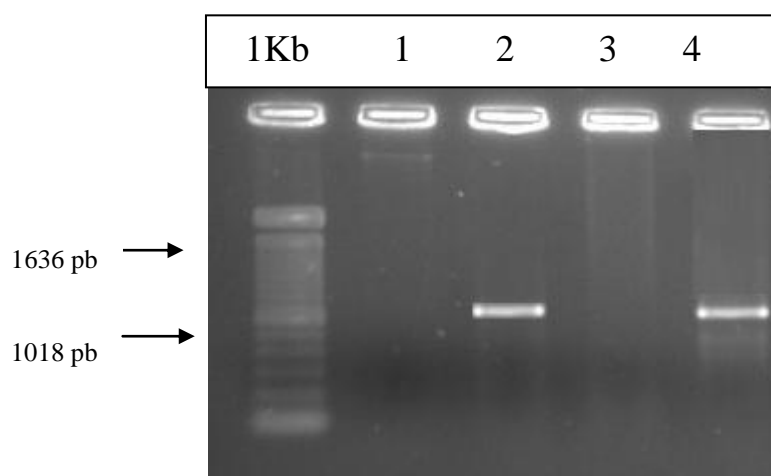


Figura 13. PCR dos isolados com os iniciadores K26. 1: *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300); 2: *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/FR/71/LRM75); 3: *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269); 4: CUR 210 Marcador Molecular 1Kb.

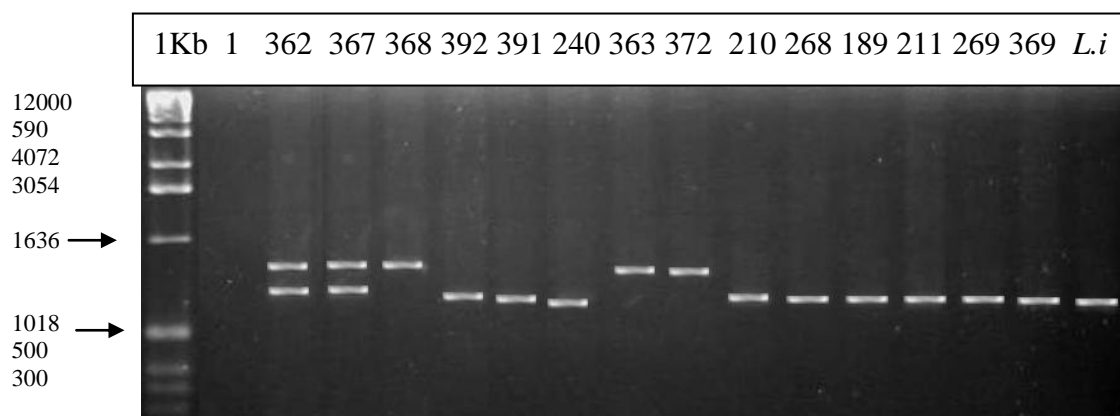


Figura 14. Amplificação de fragmento gênico K26 por PCR dos isolados. Eletroforese em gel de agarose a 1,6% exemplificando as bandas obtidas. 1: Controle negativo; 2: CUR362; 3: CUR367; 4: CUR368; 5: CUR 392; 6: CUR391; 7: CUR240; 8: CUR363 ; 9: CUR372 ; 10: CUR210; 11: CUR268; 12: CUR189; 13: CUR211; 14: CUR269; 15: CUR369; 16: Cepa referência de *L.infantum*. Marcador Molecular 1Kb.

5.3 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO – RFLP

A caracterização das amostras foi pela presença ou ausência de bandas na qual considerou -se apenas as bandas mais fortes. Com a utilização da endonuclease de restrição *Rsa*I foi detectado a presença de homogeneidade genotípica nas amostras proveniente de diferentes regiões endêmicas do país e a cepa referência de *L.(L.)infantum* MHOM/FR/71/LRM75.

As vinte amostras estudadas apresentaram um mesmo perfil de bandas, mesmo as que apresentaram diferenças polimórficas para o gene K26, desta forma foi colocado apenas um gel para evidenciar esta digestão (Fig. 15).

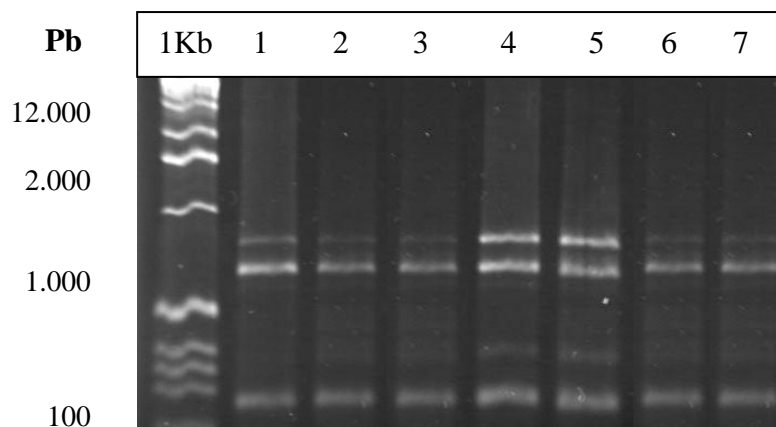


Figura 15. Perfil das bandas obtidas após a digestão com a endonuclease RsaI do produto de PCR do gene K26. 1: Cepa referência de *L.infantum*; 2: CUR 391; 3: CUR 376; 4: CUR 240; 5: CUR 284; 6: CUR 372; CUR 362.

5.4 SEQUENCIAMENTO

Dentre os isolados amplificados para o gene K26, cinco amostras apresentaram padrões diferenciados de bandas em relação à cepa referência *L.infantum*: CUR362, CUR367, CUR368, CUR363 e CUR372 (Fig.16). Sendo assim, foram selecionados duas amostras, CUR362 e CUR372 polimórficas em relação à cepa referência e a amostra 268 semelhante a *L.infantum*. Os isolados foram sequenciados e comparados com cepas de *L.infantum* amplificadas para o gene K26 e, disponíveis Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Observou-se que os isolados da Europa MHOM/78 e MHOM/1995 provenientes da França e MHOM/2001 provenientes da Grécia, foram agrupadas num mesmo clado, revelando maior proximidade genética quando comparadas com os isolados do Brasil. Isolados de *L.infantum* provenientes do Brasil, *L.infantum*/268 e *L.infantum*/372 formaram um clado distinto das demais amostras, indicando maior distância genética quando comparados com as cepas da Europa.

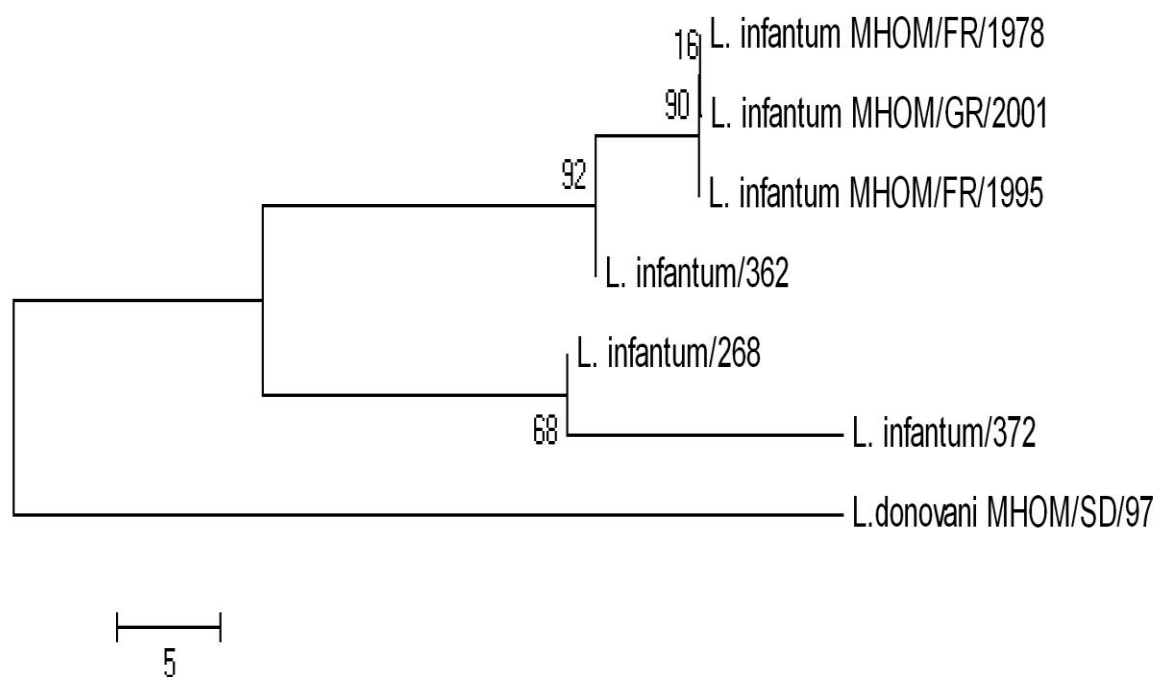


Figura 16. – Neighbor Joining do gene K26 de cepas da Europa: *L. infantum* MHOM/FR/1978 (França), *L. infantum* MHOM/GR/2001 (Grécia) e *L. infantum* MHOM/FR/1995 (França) e cepas do parasito isoladas de cães procedentes de diferentes regiões do Brasil: CUR362, CUR268 e CUR372. *L. donovani* MHOM/SD/97 (Sudão) foi usada como out group.

DISCUSSÃO

O parasitismo por *Leishmania* pode resultar em infecção assintomática ou diferentes formas clínicas da doença. A evolução da infecção para a doença dependeria de múltiplos fatores tais como, suscetibilidade do hospedeiro, características genéticas e estado nutricional. E por ser hospedeiro acidental do parasita, o homem tende a reagir mais intensamente a invasão do protozoário, caracterizando uma relação anômala e recente, em termos de evolução. Nos animais são frequentes as infecções inaparentes, caracterizando uma relação mais antiga (COURA, 2005).

Dos humanos pesquisados tivemos sucesso no isolamento da cepa CUR375, de um indivíduo sem sintomatologia clínica que veio da região de Mato Grosso do Sul. Costa et al. (2002), também relatam que em humanos o parasito pode ter o mesmo comportamento que em cães, seus reservatórios, e que poderia também servir de fonte de infecção para o inseto vetor. É provável que em zona endêmica tenham mais casos similares a este observado e que deveriam ser levados em consideração para eventuais medidas de controle. Haralambus et al., (2008) relatam que a soroprevalência em seres humanos de LV em assintomáticos e sintomáticos pode variar de 0,5% a 9,2% e de 12,6% a 33,4%, respectivamente, e que, em cães os intervalos de soroprevalência entre assintomáticos e sintomáticos são de 10,8% a 24,4% e de 40% a 48,4%, respectivamente. Costa (2002) em estudo sorológico para demonstrar o número de portadores assintomáticos para LV, utilizando pessoas sem sinais clínicos e que tiveram recentemente alguém próximo ou cão com diagnóstico positivo para LV, verificou que das 108 amostras 71% eram reativas. Contudo, o número de casos assintomáticos é de difícil precisão uma vez que testes diagnósticos para detecção de casos humanos e caninos assintomáticos apresentam baixa concordância (FUNASA, 2002).

Em nossos estudos foram encontrados animais e um indivíduo positivos, porém, assintomáticos o que serve de alerta, pois os mesmos podem servir de fonte de infecção para os flebotomíneos e disseminação da doença como já ressaltaram Alvar et al. (2004), desde que encontrem ecótopos e vetores específicos em outras regiões. Como não há controle de migração dos cães e não há exigência de exame para leishmaniose o transporte de animais de zona endêmica para zona indene provavelmente vem ajudando na difusão do parasito.

Para a avaliação da variabilidade genética do parasito os iniciadores utilizados geraram perfis de bandas polimórficos para os diferentes isolados em relação à cepa referência de *L. infantum* podendo ser visualizado no fenograma construído com coeficiente de Jaccard (Fig. 10), Árvore não enraizada (Fig. 11) e Filograma de Nei e Li's (Fig. 12).

Kosman e Leonard (2005) citam que as diferenças no padrão de bandas surgem como mutações de um ancestral comum, enquanto diferenças dentro das populações pode refletir também outros fatores como efeito fundador e o fluxo gênico entre as populações.

A análise fenética agrupou os isolados de *Leishmania* em dois ramos distintos, que correspondem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, similar aos resultados obtidos com isoenzimas por Thomaz- Soccol et al. (1993) a e b; Bañuls, et al. (1999).

Em relação à variabilidade intra-específica dos isolados, foi possível verificar uma separação consistente relacionada à origem geográfica especialmente para as amostras provenientes de Minas Gerais e São Paulo que se unem em ramos próximos, como ocorre também com isolados da região Centro-Oeste.

Toledo et al. (2002) separaram amostras de *L. infantum* em dois clusters, de acordo com a origem geográfica, em seus estudos com RAPD para polimorfismo genético de espécies simpátricas do gênero *Phlebotomus*, tendo sido encontrado diferença entre espécies do Leste e a população do Oeste da Espanha.

Alguns isolados do Mato Grosso do Sul estariam na base do fenograma podendo indicar o sentido da migração do parasito, após o recrudescimento da doença no país. No Mato Grosso do Sul houve uma grande epidemia de LV (ANTONIALLI et al., 2007) e o mesmo foi observado no Estado de São Paulo (TOLENZANO et al., 2003; NUNES et al., 2008). Ao analisar dados epidemiológicos ou ambientais que poderiam ter desencadeado tal surto epidêmico, observa-se que a construção do gasoduto Bolívia-Brasil que passa por estes dois Estados (Fig. 17a, 17b) alterou o ambiente, promovendo condições de dispersão do parasito. Em função disto, é possível sugerir a hipótese de migração recente do parasito e do recrudescimento de focos existentes nestas áreas por onde passou o referido gasoduto.



Figura 17a - Traçado da construção do gasoduto Bolívia Brasil.

Fonte: http://reservaer.com.br/estrategicos/figuras-est-2/Bolivia_Brazil_oleoduto.jpg



Figura 17b- Modificações ambientais observadas durante a construção do gasoduto. Fonte: arautodofuturo.wordpress.com/.../gasoduto-x-bau/

O perfil de restrição com a enzima *RsaI* evidenciou que todos isolados foram monomórficos, incluindo a cepa referência de *L. (L.) infantum* proveniente da França. Assim, observa-se que as amostras de várias regiões do Brasil e a cepa MHOM/FR/71/LRM75 da França, se encontram em um mesmo grupo como observado por Haralambus et al. (2008). Estes autores utilizaram o gene K26 e a enzima de restrição *RsaI* em *L. infantum* MON-1, encontrando dois subgrupos e relação geográfica

entre as amostras, na qual as amostras da Espanha e Portugal se encontram no mesmo grupo.

Pacheco et al. (1986) utilizando perfil de restrição do kDNA em estudo com amostras de *Leishmania* da Bahia e Rio de Janeiro, observaram distância genética entre amostras destes estados e entre cepas de *L.infantum* da França e *L.donovani* da Índia. Nabila et al. (2008) utilizando a mesma técnica identificaram 15 genótipos diferentes em quatro zimodemas analisado na Argélia.

Lainson & Rangel (2005) afirmam que utilizando a técnicas moleculares de RFLP não observaram diferenças entre *L.infantum* e *L.chagasi*, como visto no presente trabalho e propõem então a separação taxonômica dos parasitos a nível subespecífico.

A região K26 de *L. infantum* apresenta 64% de identidade a *L. major*. Para *L. major* o gene apresenta grande polimorfismo (McKEAN et al., 1997). Segundo estudos realizados por Haralambus et al., (2008) estes polimorfismos genéticos estão relacionados à origem geográfica dos isolados.

No presente estudo, a amplificação do gene K26 por PCR para os 20 isolados apresentou três perfis de bandas: um com peso molecular de 970 pb, outro com 1295 pb e um terceiro que apresentou banda dupla (970/1295 pb). Haralambus et al. (2008) verificaram que amostras de *L. infantum* proveniente da Europa apresentaram distintos perfis que variaram de 385 a 1300pb. Já os provenientes da África foram de fácil identificação pois os fragmentos de *L. donovani* foram de 284pb e os de *L.infantum* de 385 a 430 pb.

Para o sequenciamento foram escolhidas amostras que apresentaram os dois padrões de bandas entre 970pb e 1295pb. Os isolados com banda dupla não foram sequenciados uma vez que as amostras, nas sucessivas amplificações ora saíam dupla banda ora com bandas de 970 pb ou ainda com 1295pb. Assim, para estas amostras foi escolhido sequenciar a banda de peso molecular de 1295pb por se apresentar mais forte e com maior frequência.

Os produtos amplificados do gene K26 apresentaram 68% a 93% de consistência com as cepas da Europa, no qual as amostras 372, 268 e 362 apresentam-se em ramos distintos como no fenograma gerado com os resultados do RAPD (Fig.10).

Os dados provenientes do sequenciamento confirmaram os resultados obtidos com a técnica de RAPD, tendo sido observado polimorfismo entre as amostras do parasito no Brasil em relação aos isolados da Europa.

Por ser considerada a mais grave entre as leishmanioses, com alta taxa de mortalidade, a LV desperta grande interesse entre os taxonomistas para desenvolver e utilizar métodos de tipagem na identificação das espécies, variabilidade genética e até novas cepas (MARZOCHI et al., 1999).

A etiologia da leishmaniose visceral, na América do Sul é atribuída a *Leishmania chagasi* por Cunha & Chagas em 1937. Estudos realizados por Deane & Deane (1955), mostram que a doença em humanos é similar a que ocorre no Velho Mundo e que o reservatório são os cães. Devido a esta similaridade, na década de 80, vários trabalhos levantam a hipótese que o parasito poderia ser o mesmo (KILLICK-KENDRICK et al., 1980; LAINSON et al., 1981; SANTORO et al., 1986; MORENO et al., 1986; MORENO, 1989).

Estudos realizados por Lanotte et al. (1981), Maazoun et al. (1984) e Moreno et al. (1986) dão suporte à hipótese proposta por Killick-Kendrick et al. (1980) que *L.chagasi* teria uma origem afro-europeana recente. Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo Moreno et al. (1986) demonstram que o parasito é semelhante à *L.infantum*. Monem em 1987 afirma que *Leishmania chagasi*, do ponto de vista morfológico e bioquímico, é indistinguível de *Leishmania infantum*, agente causador do calazar no Mediterrâneo e em partes da África e Ásia.

Contudo, outras hipóteses a respeito da verdadeira origem da *L.chagasi*, são propostas. Shaw e Lainson (1979) sugeriram que a leishmaniose visceral americana pudesse ser causada pelos dois parasitos *L.chagasi* e *L.infantum*, mesmo com a grande semelhança observada entre os parasitos do Velho e Novo Mundo. Lainson (1989) propõe que *L. chagasi* já existia nas Américas muito antes da colonização dos Portugueses e Espanhóis, uma vez que foram observadas diferenças nos perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de suas promastigotas. Killick-Kendrick et al. (1980), observaram que a grande distribuição geográfica da LV em tão curto espaço de tempo e a natureza benigna da infecção natural em *Cerdocyon thous* um canídeo originário da Amazônia, indicaria uma relação antiga do parasito com o hospedeiro sugerindo que esta infecção já existiria sendo repassada aos cães ao longo do tempo, e por estes animais não serem adaptados, desenvolveriam a doença.

A literatura disponível sobre variabilidade genética de *L.chagasi* e *L.infantum* são baseadas em análises isoenzimáticas (MORENO et al., 1986; SHAW et al., 1991; THOMAZ-SOCCOL, 1993; CUPOLILLO et al., 1995) ou anticorpos monoclonais

(McMAHON-PRATE & DAVID, 1981; Mc MAHON-PRATE et al., 1982; SHAW et al., 1987; 1989). Os estudos com DNA são mais recentes, tanto *L. donovani* quanto *L. infantum* vêm sendo estudados para melhor compreensão da origem e biogeografia deste complexo. Maurício et al. (2000) estudando as relações genotípicas dentro do complexo *L. donovani* através de RAPD e RFLP, demonstraram que *L. infantum* e *L. chagasi* são geneticamente indistinguíveis e formam um grupo monofilético dentro do complexo, contudo apenas três cepas de *L. chagasi* foram utilizadas a cepa MHOM/PA/78/WR285 proveniente do Panamá, MCAN/BR/89/DOG124 de cão e a MHOM/BR/74/PP75 de humano, provenientes do Brasil.

Lukes et al. (2007) em análise genética multifatorial, com aproximadamente 1800 caracteres para cada uma das 25 cepas geograficamente representativas das áreas na Europa, África e Ásia, mas não da América, onde ocorrem representantes do complexo *L. donovani* observaram que o genótipo é fortemente correlacionado com a origem geográfica. Haralambous e colaboradores em 2008 desenvolveram um método molecular por RFLP/PCR do gene K26 para discriminar zymodemas *L. donovani*/*L. infantum* e constataram que o método desenvolvido para tipagem molecular utilizando a PCR com o gene K26, não só tem um alto poder discriminatório, mas é capaz de identificar o DNA do parasita pertencente ao Complexo *L. donovani* diretamente de amostras clínicas.

Em nosso estudo, constatamos a predominância de amostras geneticamente dissimilar, quando comparado com as cepas do Velho Mundo. Determinados isolados se agrupam com as de origem no Velho Mundo e outras ficam completamente isoladas. Assim, as técnicas de PCR-K26, RAPD e sequenciamento indicaram que existe variabilidade genética entre os isolados analisados, o que nos leva a corroborar com a hipótese de Shaw e Lainson (1979) que *L. infantum* e *L. chagasi* nas Américas poderiam ser simpátricas. Entretanto, é imprescindível que uma investigação mais ampla, envolvendo um número maior de amostras de outras regiões do Brasil e, principalmente do Velho Mundo, sejam analisadas seguindo a mesma metodologia, para que seja reavaliada a posição taxonômica de *L. infantum* nas Américas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

1. A identificação dos 20 isolados de *Leishmania* de animais e humanos, pela técnica de PCR, com os iniciadores RV1/RV2 evidenciou similaridade com a cepa referência de *L. infantum* proveniente da França;
2. A técnica de RAPD aplicada aos 20 isolados de *Leishmania* de diferentes regiões do Brasil mostrou alto grau de polimorfismo genético intra-específico em relação à cepa referência;
3. A restrição de fragmentos (RFLP) do gene K26 com a endonuclease *RsaI* mostrou que os isolados são monomórficos;
4. A técnica de PCR com iniciadores para o gene K26 mostrou três padrões de bandas com 970pb, 1295pb e 970/1295pb.
5. O sequenciamento agrupou alguns isolados com *L. infantum* proveniente do Velho Mundo, enquanto outros se isolaram em grupos independentes.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ABRANCHES P., SILVA-PEREIRA M.C.D., CONCEIÇÃO-SILVA F.M., SANTOS-GOMES G.M., JANZ J.G. Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **International Journal for Parasitology**, v.77, n.4, p.557–561, 1991.
- ALVAR J., CANAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n.3, p. 1–88. 2004.
- ANTHONY J.F., GRIFFITHS, JEFFREY H., MILLER, DAVID T., SUZUKI, RICHARD C. LEWONTIN, WILLIAM M. GELBART, “An introduction to genetic analysis”, 7th **Editora Freeman**, 1999.
- BANULS A.L. Apport de la genetique evolutive a l’epidemiologie et a la taxonomie du genre *Leishmania*. Montpellier, França. **Tese de doutorado, Université MontpellierII**. 196f., 1998.
- BANULS A.L., GUERRINI F., LE PONT F., BARRERA C., ESPINEL I., GUDERIAN R., ECHEVERRIA R., TIBAYRENC M. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.44: p.408-411.1997.
- BARKER DC, ARNOT DE. Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 3(1):33-46, 1981.
- BHATIA A., DAIFALLA NS., JEN S., BADARO R., REED SG., SKEIKY YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.102:249-261, 1999.
- BOTSTEIN D., WHITE RL., SKOLNICK M., DAVIS RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 32(3):314-31, 1980.
- BRASIL - Ministério da saúde- Portal da Saúde. <http://portal.saude.gov.br>, 2006.
BRASIL: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/2009>
- CASTRO E.A., THOMAZ-SOCCOL V., AUGUR, C. LUZ E. Standardization of ELIS (Enzyme linked immunosorbent Assay) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In: Roussos, S., Soccol, C.R., Pandey, A., Augur, C. (Eds.), **New Horizons in Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers, p.421-428, 2003.
- COSTA, C. H. N.; JAY, M. S.; REGIS, B. B. G.; LOURDES, M. G.; PATRÍCIA, K. S.R.; BOSSA, M.; ABHAY, S.; SERATH, D. Y.; REGINA, S. S.; MAURO, R. B. S.; SHAW, J. J.;

DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 66(4), p.334-7, 2002.

CHICHARRO C, MORALES MA, SERRA T, ARES M, SALAS A, ALVAR J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. 93-99, 2002.

CUNHA, AM e CHAGAS E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, **Nota prévia Hospital**, v. 11(2), p. 148-152, 1937.

CUPOLILLO E, GRIMALDI JUNIOR G, MOMEN H, BEVERLEY SM Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular. Biochemical Parasitology**, 73:145-155, 1995.

COURA JR, Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias. ed. **Guanabara**, vol I, 2005.

DANTAS-TORRES F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101:117-118, 2006.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro: **Serviço nacional de educação sanitária**, 161 p., 1955.

DEDET JP., DEREURE J., VANWAMBEKE SO., MALÉ P., MARTINEZ S., PRATLONG F., BALARD Y. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. **Vector Borne Zoonotic Dis.**9(6):687-94, 2009.

DEREURE J., LANOTTE G., PRATLONG F., GOUVERNET J., MAJHOUR J., BELAZZOUG S., KHIAMI A., RAGEH H.A., JARRY D., PERIERES J., RIOUX J.A. Canine leishmaniasis from *Leishmania infantum*: value and production of the latex test. Ecoepidemiologic applications. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, 91: 300-5, 1998.

DESJEUX P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Organization Statistics Quarterly**, 45: 267-275. 1992.

DESJEUX P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinical Dermatology** 14:417-423, 1996.

DESJEUX P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2(9), p.692, 2004.

FUNASA-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br> Acesso em 15 jan. 2010.

GALATI EA., NUNES VL., REGO JÚNIOR FDE A., OSHIRO ET., CHANG MR. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Saúde Pública**, 1997.

GARCIA-NAVARRO C.E., PACHALY J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo, Livraria e Editora Varela, 1994.

GOMES R. F., MACEDO AM., PENA SD., MELO MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Experimental Parasitology**. v. 80(4), p. 681-687, 1995.

GRODZICKER T., ANDERSON C., SHARP PA., SAMBROOK J. Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. I. Host range mutants of Ad2+ND1. **The journal of Virology**.v.13(6):1237-44, 1974.

GUERBOU J S., GUIZANI I., SPEYBROECK N., LE RAY D., DUJARDIN JC. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure. **Parasitology**. 122 Pt 1:25-35, 2001.

GUPTA S., ANDERSON RM. Population structure of pathogens: the role of immune selection. **Parasitol Today** 15:497-501, 1999.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41:95–98, 1999.

HARALAMBOUS C., ANTONIOU M., PRATLONG F., DEDET JP., SOTERIOU K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 60(1):33-42, 2008.

IVENS AC., PEACOCK CS, WORTHEY EA, MURPHY L, AGGARWAL G, BERRIMAN M, SISK E, RAJANDREAM MA, ADLEM E, AERT R, ANUPAMA A, APOSTOLOU Z, ATTIPOE P, BASON N, BAUSER C, BECK A, BEVERLEY SM, BIANCHETTIN G, BORZYM K, BOTHE G, BRUSCHI CV, COLLINS M, CADAG E, CIARLONI L, CLAYTON C, COULSON RM, CRONIN A, CRUZ AK, DAVIES RM, DE GAUDENZI J, DOBSON DE, DUESTERHOEF A, FAZELINA G, FOSKER N, FRASCH AC, FRASER A, FUCHS M, GABEL C, GOBLE A, GOFFEAU A, HARRIS D, HERTZFOWLER C, HILBERT H, HORN D, HUANG Y, KLAGES S, KNIGHTS A, KUBE M, LARKE N, LITVIN L, LORD A, LOUIE T, MARRA M, MASUY D, MATTHEWS K, MICHAELI S, MOTTRAM JC, MÜLLER-AUER S, MUNDEN H, NELSON S, NORBERTCZAK H, OLIVER K, O'NEIL S, PENTONY M, POHL TM, PRICE C, PURNELLE B, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, REINHARDT R, RIEGER M, RINTA J, ROBBEN J, ROBERTSON L, RUIZ JC, RUTTER S, SAUNDERS D, SCHÄFER M, SCHEIN J, SCHWARTZ DC, SEEGER K, SEYLER A, SHARP S, SHIN H, SIVAM D, SQUARES R, SQUARES S, TOSATO V, VOGT C, VOLCKAERT G, WAMBUTT R, WARREN T. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**. Jul 15;309(5733):436-42, 2005.

KARY MULLIS. **www.karymullis.com**, 1983.

KILLICK-KENDRICK R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.) *Biology of the Kinetoplastida*, **London: Academic Press**, v. 2, p. 395-460, 1979.

KILICK-KENDRICK R., MOLYNEUX D. H., RIOUX J.A., LANOTTE G., LEANEY A. J. Possible origins of *Leishmania chagasi*. **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, 563-565, 1980.

KILLICK-KENDRICK R., RIOUX J.A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. **Parasitology**, 44: 67-71, 2002.

KOSMAN E., LEONARD J. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. **Molecular Ecology**, p415-424, 2005.

LACERDA D., MARIA D.PACEDO, JOSÉ P. LEMOS FILHO, MARIA LOVATO. A técnica de RAPD: Uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana** 3(21) 87-92.2002

LACHAUD L., MARCHERGUI-HAMMAMI S., CHABBERT E., DEREURE J., DEDET J.P., BASTIEN P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 1 p. 210-215, 2002.

LAINSON R. & SHAW J. J. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: *Biology of the Kinetoplastida*. **London: Academic Press**. v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON R., SHAW J.J., READY P.D., MILES M.A., PÓVOA M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, 1981.

LAINSON R. & SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology*. **London: Academic Press**. v. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON R., SHAW J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitology Human**, v. 63(2), p. 134-145, 1988.

LAINSON R., SHAW J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Ann Parasitology Human Comp.**;64(1):3-9, 1989.

LAINSON R. & RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: **A review. Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100(8), p. 811-827, 2005.

LANOTTE G, RIOUX JA, MAAZOUN R, PASTEUR N, PRATLONG F, LEPART J. The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic

characters. Epidemiological and phyletic significance. **Ann Parasitology Human.**, 1981.

LEVINE ND., CORLISS J.O., COX FE., GRAIN J., HONIGBERG BM. A newly revised classification, **Journal Parasitology**, 66: 830-834, 1980.

LIMA R.M.G., GUIMARÃES S.E.F., PINHEIRO L.E.L. Fatores que afetam a amplificação de DNA pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.50, n. 4, p. 401-407, 1998.

LUKES J., MAURICIO I.L., SCHÖNIAN G., DUJARDIN J.C., SOTERIADOU K., DEDET J.P., KUHL S., TINTAYA K.W., JIRKŮ M., CHOCHOLOVÁ E., HARALAMBOUS C., PRATLONG F., OBORNÍK M., HORÁK A., AYALA F.J., MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.**, 104: 9375-9380, 2007.

MAAZOUN R., G. LANOTTE N. PASTEUR, J. A. RIOUX, M. F. KENNOU, F. PRATLONG. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévenne, Côte-d'Azur, Corse et Tunisie. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v.56:p.131-146., 1981.

MADEIRA,A.

<http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239906534180PROGRAMADEVIGECONTROLE.pdf>. 2009.

MARZOCHI M.C.A., SCHUBACH A.O., MARZOCH K.B.F. – Leishmaniose tegumentar americana. In: Cimerman e Cimerman. **Parasitologia Humana e seus Fundamento Gerais**. São Paulo: Atheneu, cap. 9, 1999.

MAURICIO I.L., GAUNT M.W., STOTHARD JR., MILES M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology** 122:393–403, 2001

MAURICIO I.L., STOTHARD JR., MILES M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today** v.16:p.188–189, 2000.

MAURICIO I.L., STOTHARD JR., MILES M.A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the minixenon. **Parasitology** v.128:p.263–267, 2004.

MCKEAN P.G., TRENHOLME K.R, RANGARAJAN D., KEEN J.K., SMITH D.F. Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology** v.86:p.225–235. 1997.

McMAHON-PRATT D. M., DAVID J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, v. 291, p. 581-583, 1981.

McMAHON-PRATT D., BENNET E., DAVID J.R. Monoclonal antibodies that distinguish sub-species of *Leishmania braziliensis*. **Journal Immunology**, v. 129, p. 926-929, 1982.

MOLINA R. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus* **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n.4, p.491-493, 1994.

MORALES M. A., CHICHARRO C., ARES M., CANAVATE C., BARKER, D.C., ALVAR J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. v. 95(1), p. 104-107, 2001.

MORALES M. A., CRUZ I., RUBIO J. M., CHICHARRO C., CANAVATE C., LAGUNA F., ALVAR J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. **Journal Infectious Diseases** v. 15, p.1533-1537, 2002.

MORENO G., RIOUX J.A., LANOTTE PRATLONG F., SERRES E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualization du Complex *L. infantum*. A propos de 146 souches originaires de l ' Ancien et Nouveau Monde. p. 119-128, In J. A. Rioux (ed.), *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. **IMEEE, Montpellier, France**, 1986.

MOTAZEDIAN H., NOYES H., MAINGON R. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. **Exp Parasitol.** Jun;83(1):150-4, 1996.

NABILA S., AMRO A., KUHLS K., BELKAID M., ZIDANE C., AL-JAWABREH A., SCHÖNIAN G. Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum*. **Microbes and Infection**. 2008.

NASON J. D., ALDRICH P. R. & HAMRICK J. L. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: Laurence, W. F. & Bierregaard Jr. R. O. (Ed.) *Tropical Forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*, Chicago: **University of Chicago Press**, pp. 304-320, 1997.

NOYES H.A., CAMPS A.P., CHANCE M.L. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. **Molecular Biochemical Parasitology**. Sep; 80(1):119-23, 1996.

NUNES C. et al., Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 153, 1-2, 6; p.19-23 2008.

OLIVEIRA C. L., MACEDO A. M., CHIARI E., PENA S. D. An alternative approach to evaluating the intra-specific genetic variability of parasites. **Parasitology Today**, v. 13, p. 196-200, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). TDR diseases/Diseases current portfolio Available <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>, 2009.

PACHECO R. S., LOPES U. G., MOREL C.M., GRIMALDI JR. G., MOMEM H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania* Taxonomy et Phylogenese. Applications Ecoepidemiologiques. Rioux, J. A. ed., p. 57-65, **IMEEE, Montpellier**, 1986.

PACHECO R. S., BRITO C. M., Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94 (1), p.199-201, 1999.

PEACOCK C. S., SEEGER K., HARRIS D. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics** v. 39, p. 839-47, 2007.

PEREIRA E.F. A. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil, **Experimental Dermatology**, v. 17, n.12, p. 1024-1030, 2008.

PRATLONG F., DEREURE J., BUCHETON B., EL-SAF S., DESSEIN A., LANOTTE G., DEDET J.P. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. **Parasitology** 122:599–605, 2001.

PRATLONG F., DEDET J.P. Leishmaniasis. In Manson's Tropical Diseases, G.C.Cook, A. Zumla (Eds.), **Saunders, London**, pp. 1339-1364, 2003.

RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P., PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et comparée**, 65:111–125, 1990.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230(4732):1350-4, 1985.

SANTOS S.O., ARIAS J., RIBEIRO A.A., HOFFMANN M.P., FREITAS R.U., MALACCO M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, 12:315-317, 1998.

SHAW J.J., LAINSON R., READY P.D. Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London**. Dec 31;206(1164):307-18, 1979.

SHAW J.J., LAINSON R., RYAN L., BRAGA R.R., McMAHON-PRATT D. Leishmaniasis in Brazil:XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. **Royal Society Tropical Medicine Hygiene** 81:69, 1987.

SHAW J.J., ISHIKAWA E.A., LAINSON R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, 83: 783-784, 1989.

SHAW J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In "World Class Parasites" vol. 4, *Leishmania*. Farrell J. P. (Ed.), **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrech, London. 193 pp. 2002.

SAMBROOK J., FRITCH E. F., MANIATIS T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2 ed. **Cold Spring harbor Laboratory Press**, USA. 1989.

SANTORO F., LESMERE J.L., RIZVI F.S., SADIGURSKY M. Spécificité au niveau des protéines de surface des promastigotes de *Leishmania donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi*. p. 71-75, In J. A. Rioux (ed.), *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. **IMEEE, Montpellier**, France, 1986.

SCHALLING H. D., OSKAM L. Molecular biological applications in the diagnostic and control of Leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine International Health**, v. 7(8), p. 641-651, 2002.

SCHLUTER S.F., HARRIS D.T., TSANG T.C., AKPORIAYE E.T., BOWDEN G.T., HERSH E.M., Simple method for adapting DNA fragments and PCR products to all of the commonly used restriction sites. **Biotechniques**. Jan;20(1):51-2, 2006.

SIMPSON L., NECKELMANN N., DE LA CRUZ V.F., SIMPSON A.M., FEAGIN J.E., JASMER D.P., STUART J.E. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, 262: 6182-6196, 1987.

SWOFFORD D.L., WADDELL P.J., HUELSENBECK J.P., FOSTER P.G., LEWIS P.O., ROGERS J.S. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. **Systems Biology**, 50(4):525-39, 2002.

TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution** 24(8):1596-9, 2007.

THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25:4876-4882, 1997.

THOMAZ-SOCCOL V., LANOTTE G., RIOUX J.A., PRATLONG F., MARTINIDUMAS A., SERRES E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v.68, n.2, p. 104-106, 1993a.

THOMAZ-SOCCOL V., LANOTTE G., RIOUX J.A., PRATLONG F., MARTINIDUMAS A., SERRES E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania*

Ross, 1903. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v.68, n. 2, p. 107-108, 1993b.

THOMAZ-SOCCOL V., CASTRO A. E., NAVARRO I. T., FARIA M. R., SOUZA M L, CARVALHO Y, BISPO S., MEMBRIVE N., MINOZZO J., TRUPPE J., BUENO W., Luz E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia**.

TIBAYRENC M., KJELLBERG F., AYALA F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v. 87(7), p. 2414-2418, 1990.

TIBAYRENC M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, p.47-115, 1995.

TIBAYRENC M., AYALA F.J. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v.1: p.465-72, 1999.

TOLEDO A., MARTIN-SANCHEZ J., PESSON B., SANCHIZ-MARIN C., MORILLAS-MARQUEZ F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 119(2), p. 257-264, 2002.

TOLEZANO JE, RODRIGUES E, BARBOSA JER, CUNHA E, TANIGUCHI HH, BARBOSA JAR, *et al.*. Expansão da Leishmaniose visceral por terras paulistas. Focos de transmissão de LV canina em municípios da região metropolitana de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36 (Supl I): p.360, 2003.

TORRICO M.C., DE DONCKER S, AREVALO J, LE RAY D, DUJARDIN J.C. In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*/*Leishmania* (Viannia) *peruviana* hybrids. **Acta Tropica**. Jan 15;72(1):99-110, 1999.

WILLIAMS J.G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. L. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WINCKER P., RAVEL C., BLAINEAU C., PAGES M., JAUFFRET Y., DEDET J.P., BASTIEN P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v.124(9):p.1688-94, 1996.